
Alkenylether von Glucose und Dextran als reaktive Intermediate

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Antje Vollmer
aus Hannover

1. Referentin:

Professor Dr. Petra Mischnick

2. Referent:

Professor Dr. Henning Menzel

eingereicht am:

24.02.2010

mündliche Prüfung (Disputation) am:

25.06.2010

Druckjahr 2010

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Vollmer, A., Voiges, K., Bork, C., Fiege, K., Cuber, K. & Mischnick, P.: Comprehensive analysis of the substitution pattern in dextran ethers with respect to the reaction conditions, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395: 1749-1768 (2009).

Tagungsbeiträge

Vollmer, A. & Mischnick, P.: Alkenyl ethers of dextran as reactive intermediates-synthesis and structural characterization on monomer level. (Poster) Fourth International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules (SCM-4), Amsterdam, Niederlande (2009).

Vollmer, A. & Mischnick, P.: Aminofunktionalisierte Polysaccharide: Synthesestrategien und Anwendungsfelder. (Vortrag) Regionaltagung Nord/Nord-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Braunschweig (2008).

Danksagung

Meiner Mentorin Frau **Prof. Dr. Petra Mischnick** danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die ständige Diskussionsbereitschaft und intensive Betreuung sowie die Möglichkeit zur Teilnahme an Fachtagungen.

Herrn **Prof. Dr. Henning Menzel** danke ich für die Übernahme des Koreferats. Der **Konrad-Adenauer-Stiftung e.V.** danke ich für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums der Begabtenförderung und die damit verbundene Förderung meiner Promotion.

Herrn **Dr. Erik Heim** sowie Herrn **Dr. Frank Ludwig** vom Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik, TU Braunschweig, danke ich für die Magnetorelaxometrie-Messungen sowie die wissenschaftlichen Diskussionen über die Charakterisierung von magnetischen Eisenoxidnanopartikeln. Herrn **Prof. Dr. Matthias Beller** und Herrn **Dr. Ralf Jackstell** danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Hydroaminomethylierungen am Leibniz-Institut für Katalyse e.V. Rostock. I would like to thank **Mrs. Anna Risberg**, KTH Stockholm, for SEM-measurements of dextran derivatives.

Den Lebensmittelchemikerinnen **Katja Cuber, Dana Lampe, Tanja Skotzki, Jana Paulsen** sowie Herrn cand. LM-Chem. **Stephan Schönfeld** danke ich für ihre Beiträge im Rahmen von Diplom-, SOP- und OC-F-Arbeiten, die zum Teil Eingang in die vorliegende Dissertation gefunden haben. Frau BTA **Silke Lehmann** danke ich für die Unterstützung bei experimentellen Laborarbeiten, die herzliche Arbeitsatmosphäre und die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Herrn **Professor Dr. Henning Hopf** danke ich für die Bereitstellung eines Laborarbeitsplatzes, die Versorgung mit wertvollen Literaturhinweisen sowie das stetige Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Dipl.-Chem. **Christian Bork** danke ich für die Rettung aus allen kleinen und großen IT-Krisen. Dem gesamten **Arbeitskreis Mischnick** mit seinen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern danke ich für die gute Zusammenarbeit, die tolle Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen kontroversen Diskussionen bei viel Kaffee, Kuchen, Sekt und Chai-Tee. Insbesondere Frau **Dr. Anne Adden**, Frau LM-Chem. **Inga Unterrieser** und Frau BTA **Silke Lehmann** danke ich für ihr offenes Ohr für Probleme aus allen Labor- und Lebenslagen.

Neben den Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich allen **Mitarbeiter/innen des Instituts für Lebensmittelchemie** danken. Frau CTA **Carola Balcke** danke ich für die Erfüllung herausfordernder Literaturwünsche und die Durchsicht der englischen Zusammenfassung. Frau LM-Chem. **Marita Baum** danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung in allen technischen Fragestellungen.

Ganz besonders möchte ich **meiner Familie** danken, die mich stets liebevoll und tatkräftig unterstützt hat und an mich geglaubt hat. Danke für Euer Vertrauen. Auch **Regina und Hermann** möchte ich für ihre Unterstützung danken. Vor allem möchte ich meinem Verlobten **Steffen** für seine fachliche und moralische Unterstützung sowie seinen unerschütterlichen Optimismus danken. Ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für alles.

Alkenylether von Glucose und Dextran als reaktive Intermediate

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Polyglucane	2
1.2	Dextrane.....	4
1.3	Dextranderivate	8
1.4	Natürliche Aminopolysaccharide	11
1.5	Aminofunktionalisierung von Polysacchariden.....	14
1.6	Magnetische Nanopartikel.....	21
2	Zielsetzung	24
3	Alkenylgruppen als strategische Intermediate	26
3.1	Synthese und Einsatzmöglichkeiten von Kohlenhydrat-Alkenylethern und Alkenylglykosiden.....	26
3.2	Reaktionen der Allylgruppe.....	34
3.2.1	Allylether als Schutzgruppen.....	34
3.2.2	Nebenreaktionen und Crosslinking von Allylgruppen	36
3.3	Alkenylgruppen als reaktive Intermediate.....	38
3.3.1	Elektrophile Addition	39
3.3.2	Ozonolyse / Oxidation zum Aldehyd	40
3.3.3	Radikalische Addition von Thiolen.....	41
3.3.4	Hydroborierung	43
3.3.5	Reduktion	44
3.3.6	Hydroaminierung.....	44
3.3.7	Sulfonierung	44
3.3.8	Weitere Möglichkeiten der Allyl-Funktionalisierung	45
4	Reaktionen an Glucose-Modellsubstanzen.....	46
4.1	Synthese geschützter Alkenylmethylglucoside	47
4.2	Epoxidierung - Stand der Forschung	48
4.3	Epoxidierung der Alkenyl-Modellsubstanzen	51
4.4	Nucleophile Ringöffnung von Epoxiden – Stand der Forschung.....	63
4.5	Ringöffnung der Modelloxirane mit verschiedenen Nucleophilen	65
4.5.1	Stickstoff-Nucleophile.....	65
4.5.2	Schwefel-Nucleophile	82
4.6	Hydroaminomethylierung – Stand der Forschung	86
4.7	Hydroaminomethylierung der Allyl-Modellsubstanz.....	87
4.8	Zusammenfassung Glucose-Modellsubstanzen.....	93
5	Analytik von Polysaccharidderivaten	95
5.1	Substituentenverteilung innerhalb der AGU	95
5.2	Substituentenverteilung entlang der Polymerkette	102
5.3	Substituentenverteilung über die Polymerketten	105
6	Alkenyldextrane	107
6.1	Allyldextrane	107
6.1.1	Synthese von Allyldextranen.....	107
6.1.2	Strukturelle Charakterisierung von Allyldextranen.....	108

6.2	Vergleich von Allyldextran mit Allylstärke und Allylamylose.....	154
6.3	Studien zur Vernetzung von Allylethern	159
6.4	Pentenyl-dextrane	160
6.4.1	Strukturelle Charakterisierung von Pentenyl-dextranen	161
6.5	Vergleich von Pentenyl-dextran mit Pentenylamylose.....	166
6.6	Morphologie der Polysaccharidderivate	168
6.7	Epoxidierung und nucleophile Ringöffnung als polymeranaloge Reaktionen	171
6.7.1	Epoxidierung von Octakis[2,3,6-tri- <i>O</i> -allyl]- γ -cyclodextrin.....	171
6.7.2	Epoxidierung und nucleophile Ringöffnung von Allyldextranen	174
6.8	Radikalische Thioladdition als polymeranaloge Reaktion	177
7	Methyldextrane	181
7.1	Synthese von Methyldextranen	181
7.2	Strukturelle Charakterisierung von Methyldextranen	182
7.3	Enzymatischer Abbau von Methyldextranen	189
8	Dextran-Eisenoxid-Nanopartikel.....	190
9	Zusammenfassung und Ausblick.....	199
10	Summary and future prospects	203
11	Material und Methoden.....	206
11.1	Chemikalien.....	206
11.2	Geräte und Materialien	207
11.3	Synthesevorschriften	213
11.3.1	Methyl-4,6- <i>O</i> -benzyliden- α -D-glucopyranosid (2)	213
11.3.2	Methyl-2,3-di- <i>O</i> -allyl-4,6- <i>O</i> -benzyliden- α -D-glucopyranosid (3)	214
11.3.3	Methyl-4,6- <i>O</i> -benzyliden-2,3-di- <i>O</i> -(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (4)	216
11.3.4	Allgemeine Vorschriften zur Epoxidierung	217
11.3.5	Methyl-4,6- <i>O</i> -benzyliden-2,3-di- <i>O</i> -(2,3-epoxypropyl)- α -D- glucopyranosid (5).....	219
11.3.6	Methyl-4,6- <i>O</i> -benzyliden-2,3-di- <i>O</i> -(4,5-epoxypentyl)- α -D- glucopyranosid (6).....	220
11.3.7	Nucleophile Ringöffnungsreaktionen.....	221
11.3.8	Hydrierung von Methyl-2,3-di- <i>O</i> -(3-benzylamino-2-hydroxy)-propyl- 4,6- <i>O</i> -benzyliden- α -D-glcp (10) und Methyl-4,6- <i>O</i> -benzyliden-2,3-di- <i>O</i> - (<i>N,N</i> -3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glcp mit H ₂ , Pd/C	225
11.3.9	Hydrierung von Methyl-2,3-di- <i>O</i> -(3-benzylamino-2-hydroxy)-propyl- 4,6- <i>O</i> -benzyliden- α -D-glcp mit NH ₄ HCOO, Pd/C	225
11.3.10	Synthese von Methyl-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -allyl- α -D-glucopyranosid (17)	226
11.3.11	Hydroaminomethylierung.....	226
11.3.12	Epoxidierung von Octakis[2,3,6-tri- <i>O</i> -allyl]- γ -cyclodextrin (18).....	229
11.3.13	Synthese von Dextranderivaten mit NaOH als Base	230
11.3.14	Synthese von Dextranderivaten mit Lithium-Dimsyl als Base	231
11.3.15	Epoxidierung von Allyldextran mit Dioxiranen (DMD/TFD)	231
11.3.16	Nucleophile Ringöffnung von epoxidiertem Allyldextran mit Cysteamin ...	232
11.3.17	Radikalische Addition von Cysteamin an Allyldextran	232
11.4	Derivatisierung für die GC-Analyse.....	233
11.5	Enzymatischer Abbau von Dextran und Dextranderivaten	235

11.5.1	Inkubation mit Dextranase.....	235
11.5.2	Enzymatische Glucosebestimmung.....	235
11.6	Substanzlisten	236
12	Anhang	239
13	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	246
14	Literatur.....	248

1 Einleitung

Kohlenhydrate zählen zu den wichtigsten Naturstoffklassen und werden biosynthetisch durch viele Organismen gebildet, zu welchen Pflanzen, Tiere, Pilze, Algen und Mikroorganismen zählen. Sie stehen mengenmäßig an erster Stelle der von Pflanzen produzierten Biomasse, dienen als Energiespeicher und aufgrund ihrer Fähigkeit zu supramolekularen Wechselwirkungen auf vielfältige Weise als Strukturbildner. Zudem sind sie Schlüsselsubstanzen bei biologischen Erkennungsprozessen. Die Hauptvertreter der Polysaccharide Stärke und Cellulose sind seit jeher wichtige Nahrungsmittel (Getreide, Kartoffeln) bzw. Nutzmaterialien (Holz, Textilien). Angesichts der Verknappung fossiler Ressourcen stoßen nachwachsende Rohstoffe auf zunehmendes Interesse in Wirtschaft und Wissenschaft, wovon zahlreiche Forschungsprojekte und Symposien zeugen. Im Jahre 2005 wurden in Deutschland im chemisch-technischen Bereich 2,7 Mio t nachwachsende Rohstoffe genutzt, was einem Anteil von 10 % aller industriell verarbeiteten Rohstoffe entspricht^[1]. Mit 1,2 Mio t haben die Kohlenhydrate Stärke, Cellulose und Zucker darunter große Bedeutung (siehe Abb. 1-1).

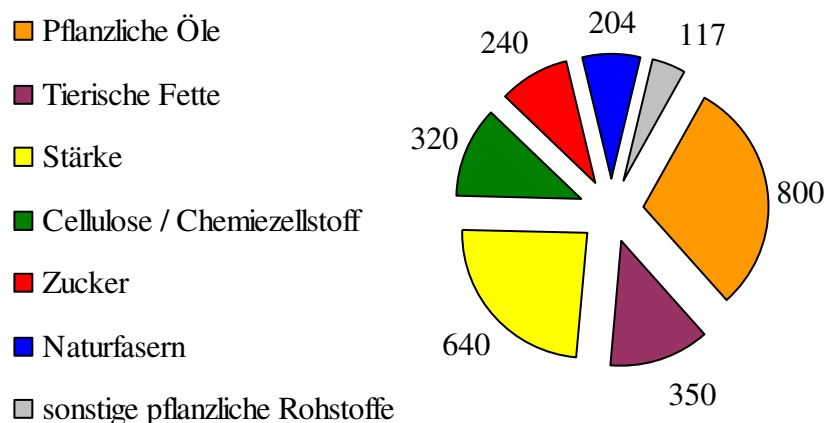


Abb. 1-1 Nutzung nachwachsender Rohstoffe durch die deutsche chemische Industrie im Jahr 2005 [in tsd t].

Durch chemische Modifizierung wird das Spektrum der industriell einsetzbaren Produkte noch erweitert^[2]. Aufgrund ihrer hohen Funktionalität (Polyhydroxyaldehyde bzw. –ketone) besitzen Kohlenhydrate die Fähigkeit zu intermonomerer Verknüpfung, die zu höheren Strukturen wie Oligomeren, Polymeren und supramolekularen Strukturen führt. Nach einfacher Verknüpfung stehen noch immer freie Hydroxylfunktionalitäten zur

Verfügung, welche Verzweigungen oder weitere Funktionalisierungen ermöglichen. Je nach Art der Monomere und deren Verknüpfung zeigen sich unterschiedlichste Eigenschaften. Allein die Substanzklasse der Polyglucane, d.h. Polysaccharide, welche einzig Glucose als Wiederholungseinheit tragen, zeigt eine große Vielfalt. Diese soll im folgenden Abschnitt etwas genauer beleuchtet werden.

1.1 Polyglucane

Polyglucane bestehen allein aus Glucose (Anhydroglucose-Einheit, AGU). Sie zeigen bereits eine große Strukturvielfalt, welche aus der Stereochemie des anomeren C-Atoms, der Position der glykosidischen Verknüpfung sowie möglichen Verzweigungsmustern resultiert (siehe Tab. 1-1).

Tab. 1-1 Übersicht über verschiedene Polyglucane und Aminodeoxyglucane.

Polyglucan	Produzent	Struktur
Cellulose	Pflanzen	β -(1→4)-D-Glucose
	Bakterien	
	Algen	
Stärke	Pflanzen	Amylose: α -(1→4)-D-Glucose
		Amylopektin: α -(1→4) und α -(1→6)-D-Glucose
Dextran	Bakterien	α -(1→6)-D-Glucose Hauptkette
		α -(1→3), α -(1→2) u./o. α -(1→4)-D-Glucose Verzweigung
Glycogen	Tiere	α -(1→4)-D-Glucose Hauptkette mit
	Mensch	α -(1→6)-D-Glucose Verzweigungen
Mutan	Bakterien	α -(1→6)-D-Glucose Hauptkette
Pullulan	Pilze	α -(1→6) verknüpfte Maltotriose- Einheiten
β -Glucane	Getreide	β -(1→3)-D-Glucose u./o. β -(1→4)-D-Glucose
Curdlan	Bakterien	β -(1→3)-D-Glucose
Schizophyllan	Pilze	β -(1→3)-D-Glucose Hauptkette
		β -(1→6)-D-Glucose Verzweigungen
Scleroglucan	Pilze	β -(1→3)-D-Glucose Hauptkette
		β -(1→6)-D-Glucose Verzweigungen
Chitin	Tiere	β -(1→4)-D-(N-acetyl)glucosamin
Chitosan	Tiere	β -(1→4)-D-Glucosamin

Die β -1 \rightarrow 4 verknüpfte **Cellulose** ist sowohl mengenmäßig als auch in der Verwendung das bedeutendste Polysaccharid. Die jährliche Biosynthese von Cellulose wird auf $2 \cdot 10^{11}$ t geschätzt^[3], womit sie gleichzeitig die häufigste organische Verbindung überhaupt darstellt. In der linearen Anordnung mit teilkristallinen Bereichen ist jede zweite AGU um 180° verdreht (siehe Abb. 1-2). Ein kooperatives Netzwerk aus Nebenvalenzbindungen (Wasserstoffbrückenbindungen) und die Rigidität der linearen Stränge sind der Grund, weshalb das Polymer trotz vieler hydrophiler Funktionalitäten nicht wasserlöslich ist. Cellulose ist der wichtigste Rohstoff zur kommerziellen Herstellung von Fasern, Partikeln und Geweben sowie einer Vielzahl von Derivaten wie Estern und Ethern, die ubiquitär Verwendung finden.

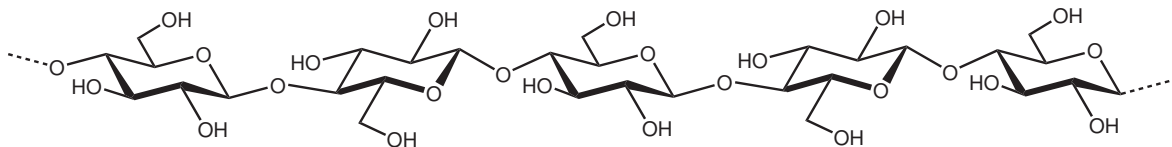


Abb. 1-2 Struktur der β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Cellulose.

Ebenfalls eine herausragende Stellung hat das Polyglucan **Stärke**. Es besteht aus der linear α -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Amylose (M_w 10^5 - 10^6 g/mol) sowie Amylopektin (M_w 10^7 - 10^8 g/mol), welches zusätzlich α -(1 \rightarrow 6) Verzweigungen trägt. Das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin variiert mit der pflanzlichen Herkunft der Stärke. Bedingt durch die Geometrie der α -glykosidischen Bindungen und der hieraus resultierenden intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen bildet Amylose im festen Zustand eine Helix mit sechs Glucose-Einheiten je Windung aus^[4]. Die Seitenketten des Amylopektins haben eine Länge von durchschnittlich 20 bis 30 Glucose-Einheiten, die über α -(1 \rightarrow 6) Bindungen mit der Primärkette verbunden sind. Die Verzweigungen treten in Clustern auf und sind für den baumartigen Aufbau verantwortlich. Die charakteristische Schichtstruktur eines Stärkekorns wird durch die alternierende Anordnung von amorphen und kristallinen Bereichen hervorgerufen, welche durch Assoziat mehrerer Amylopektinmoleküle ausgebildet werden. Das in den Amyloplasten gebildete Polysaccharid dient als Energiespeicher für Pflanzen und wird von Mensch und Tier als Energielieferant geschätzt. Eine

große Zahl physikalisch und chemisch modifizierter Stärken deckt diverse Anwendungen in vielen Bereichen des Alltags ab.

Neben Cellulose und Stärke, die hauptsächlich aus verschiedenen pflanzlichen Quellen isoliert werden, gibt es weitere Polyglucane, die von Mikroorganismen wie Pilzen oder Bakterien gebildet werden. Im Folgenden seien einige Beispiele genannt.

Curdlan ist ein lineares Homopolymer, welches einzig aus β -(1→3) verknüpften Glucosebausteinen besteht. Die lineare Form wird nur von bestimmten Bakteriengattungen (*Alcaligenes* und *Agrobacterium*) produziert^[2]. Polysaccharide vom Curdlan-Typ finden sich dagegen in einer Vielzahl von Pilzen, Hefen, Algen, Bakterien und höheren Pflanzenarten. Das neutrale Polymer **Scleroglucan** zeigt β -(1→3) Verknüpfungen in der Hauptkette mit β -(1→6) Verzweigungen an jeder dritten Glucoseeinheit. Scleroglucan wird extrazellulär von *Sclerotium* Arten gebildet^[2]. Dieselbe chemische Struktur weist das Polysaccharid **Schizophyllan** auf, welches sich nur in der Herkunft unterscheidet. **Pullulan** ist ein lineares Polymer aus Maltotrioseeinheiten, welche über α -(1→6) Bindungen miteinander verbunden sind. Strukturell kann es zwischen Amylose und Dextran eingeordnet werden. Das wasserlösliche, neutrale Kohlenhydrat wird extrazellulär von bestimmten Pilzarten (*Aureobasidium pullulans*) gebildet. **Mutan** zeigt α -(1→6) Verknüpfungen und ist eng verwandt mit Dextran.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem Polyglucan **Dextran**, weshalb dieses Polysaccharid im folgenden Abschnitt etwas genauer betrachtet wird.

1.2 Dextrane

Dextrane werden mikrobiell aus Saccharose gebildet und sind seit langem als Kontamination in Lebensmitteln bekannt. Bereits Pasteur konnte 1861 die Bildung von Dextranen in Wein beobachten und bewies, dass Mikroorganismen für die Synthese verantwortlich sind^[5]. Scheibler fand 1874 heraus, dass es sich bei Dextranen um Kohlenhydrate der allgemeinen Formel $(C_6H_{10}O_5)_n$ handelt. Der große positive optische Drehwert (in Wasser 195-201 °) führte schließlich zur Bezeichnung „Dextran“^[6]:

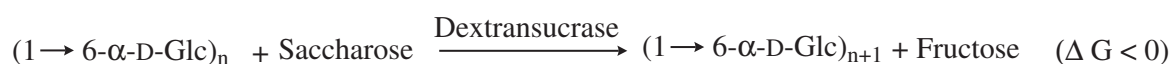
„Dieses rechtsdrehende Gummi erwies sich [...] als ein Anhydrid der Dextrose (Stärke-zuckers), und ertheile ich demselben daher den Namen „Dextran“.“

–Dr. C. Scheibler, 1874–

Ein ambivalentes Verhältnis zu Dextranen zeigt die Lebensmittelbranche. In Zuckerrefinerien führt die Kontamination mit Dextranen aufgrund der hierdurch erhöhten Viskosität des Saftes zu Problemen bei der Filtration. Zudem stört Dextran die Kristallisation der Saccharose^[7]. Der Verzehr von Dextran in kleinen Mengen ist als Kontaminant von z.B. Haushaltszucker, Früchten oder Säften nicht unüblich. Dextran kann bakteriell im humanen Verdauungstrakt abgebaut und die Hydrolyseprodukte absorbiert werden. In den 1950-1960er Jahren wurden sehr viele Patente für die Anwendung von Dextranen als Lebensmittelzusatz angemeldet, jedoch wurden diese nicht weiter verfolgt bzw. die notwendigen toxikologischen Studien für eine Zulassung nicht durchgeführt^[8]. 1977 wurde Dextran der GRAS (generally recognized as safe) Status aberkannt, da es zu jener Zeit nicht als Lebensmittelzutat verwendet wurde^[9]. 2001 wurde eine Dextranzubereitung als neuartige Lebensmittelzutat für Backwaren durch eine EU-Entscheidung gemäß der VO (EG) 258/97 zugelassen^[10].

Die kommerzielle Verbreitung von Dextran und seinen Derivaten ist aufgrund des deutlich höheren Preises (ca. 200 €/kg) im Vergleich zu den meisten Stärke- oder Cellulosederivaten limitiert. Sein Potenzial liegt vor allem in der Verwendung als Spezialchemikalie in der Pharmazie, Medizin und Industrie. Die Jahresproduktion an Dextran und seinen Derivaten lag 2004 bei ca. 2600 t und erzielte einen Marktwert von 520 Mio. €^[11]. Heutzutage erscheinen jährlich mehr als 1000 Publikationen über Dextrane und seine Derivate^[8], welche das wissenschaftliche Interesse an dieser Substanzklasse eindrucksvoll unterstreichen.

Die Biosynthese der überwiegend α -(1 \rightarrow 6) verknüpften neutralen Dextrane (siehe Abb. 1-3) wird durch verschiedene, meist gram-positive, fakultativ anaerobe Bakterien wie *Leuconostoc* und *Streptococcus* Stämme vollzogen. Die Bildung erfolgt extrazellulär mit Hilfe des Enzyms Dextransucrase (E.C. 2.4.1.5), einer Glycosyltransferase. Sie katalysiert die Übertragung von D-Glucopyranosyl-Untereinheiten von Saccharose auf die wachsende Dextrankette. Als Akzeptoren können neben Glucose u.a. auch Maltose, Isomaltose und Nigeroose dienen. Hierbei wird Fructose freigesetzt und von den Zellen aufgenommen^[12].



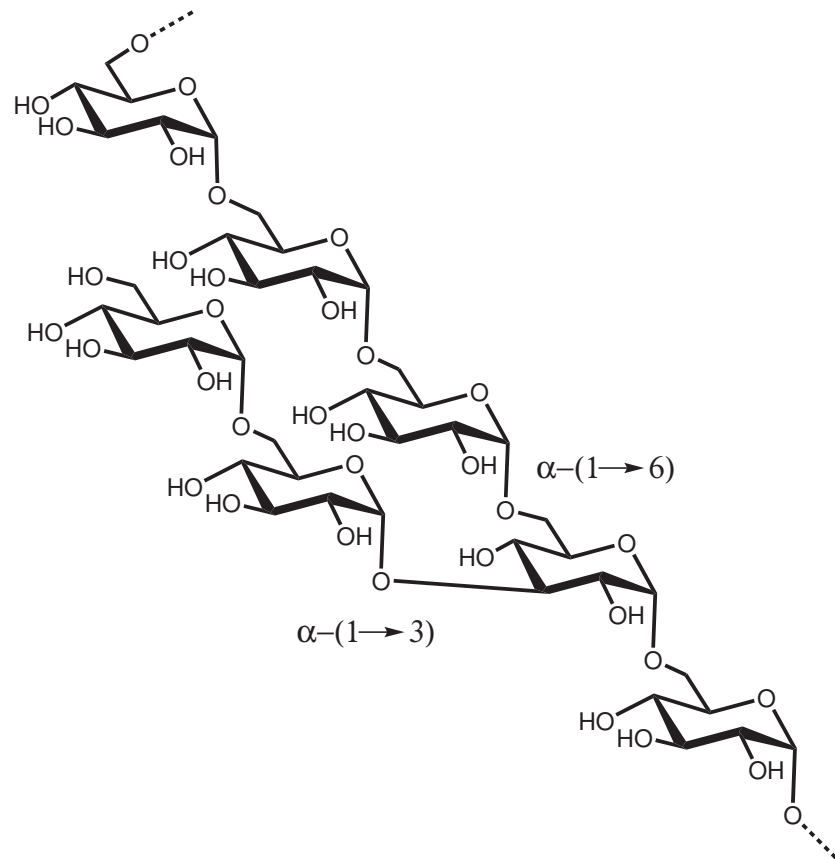


Abb. 1-3: Strukturausschnitt eines Dextrans aus *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F).

Die Reaktion verläuft aufgrund der Erniedrigung der freien Gibbsschen Enthalpie in Richtung Dextran und führt so zu hochmolekularen Produkten^[13] von 5-500.000 kDa^[7]. Orale *Streptococcus*-Stämme produzieren ebenfalls Dextrane, welche zusammen mit Mutan die Matrix der Dental-Plaue bilden. Die Polymere werden von den Zellen nicht wieder abgebaut und so nicht z.B. zur Energiegewinnung genutzt, weshalb eine Funktion als Speicherkohlenhydrat hier unwahrscheinlich ist. Möglicherweise dienen die Exopolysaccharide dazu, die Zellen vor Austrocknung zu schützen^[12].

Die kommerzielle industrielle Produktion von Dextranen erfolgt mit Lebendkulturen des Stammes *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F im fermentativen Batch-Verfahren. Im Rührreaktor wird ein komplexes Medium aus Saccharose, Maisquellwasser, Hefeextrakt, Pepton und anorganischen Salzen bereitgestellt. Der pH-Wert beträgt zu Beginn ca. 7, die Temperatur + 25 °C und die Saccharose-Konzentration 2 %. Die Fermentation wird 24 bis 48 Stunden durchgeführt. Eine höhere Temperatur führt zu einem stärkeren Verzweigungsgrad der Produkte^[14], eine höhere Saccharosekonzentration zu

niedrigeren Molekulargewichten und einem geringeren Anteil an Verzweigungen^[8,15]. Das gebildete Dextran wird durch Präzipitation in organischen Lösemitteln (v. a. Alkohole) isoliert. Eine nachträgliche Einstellung des Molekulargewichtes wird durch fraktionierte Fällung, Säurehydrolyse oder enzymatischen Teilabbau erreicht^[8].

Von geringer Bedeutung jedoch prinzipiell möglich ist die chemische Synthese von Dextranen zum Beispiel durch kationische Ringöffnungspolymerisation (CROP) von 1,6-Anhydro-2,3,4-tri-*O*-allyl- β -D-glucopyranose mit anschließender Abspaltung der Allylgruppen^[16] (siehe hierzu auch Kapitel 3).

Von besonderem Interesse ist Dextran aufgrund seiner biologischen Abbaubarkeit. Im menschlichen Körper kann es durch verschiedene α -1-Glucosidasen (Dextranasen) in Leber, Milz, Niere und im unteren Teil des Gastrointestinaltraktes depolymerisiert werden^[7]. Die hohe Biokompatibilität und physiologische Unbedenklichkeit (nicht immunogen, nicht antigen) sind weitere Eigenschaften, welche Dextrane als Biopolymere für viele Anwendungen interessant machen.

Dextrane sind definiert als Glucane mit überwiegend α -(1 \rightarrow 6)-Verknüpfungen. Innerhalb dieser allgemeinen Eingrenzung kann die chemische Struktur aufgrund der Synthese durch unterschiedliche Bakterienstämme jedoch beträchtlich variieren^[12]. Das kommerziell bedeutsamste Dextran aus *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F besteht aus einer α -(1 \rightarrow 6) verknüpften Hauptkette und zeigt ca. 5 % Verzweigung in Form von α -(1 \rightarrow 3)-Verknüpfungen^[17,18], welche zu 85 % ein oder zwei Glucosebausteine lang sind^[19] (siehe Abb. 1-3). Die verbleibenden Seitenketten tragen wahrscheinlich mehr als dreißig Glucosebausteine, so genannte „long range branchings“^[12]. Die Verzweigungen, deren Ausmaß unabhängig vom Molekulargewicht zu sein scheint^[20], sind dabei eher regelmäßig entlang der Polymerkette verteilt^[21]. Jedoch wird bei einem nachträglichen hydrolytischen Partialabbau von Dextranen aus *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) zur Einstellung eines geringeren Molekulargewichtes ein weniger verzweigtes Dextran erhalten, da hierbei die labileren α -(1 \rightarrow 3) Verknüpfungen zuerst gespalten werden^[8]. Somit ist bei einer solchen Verfahrenstechnik die Verzweigung des Dextrans umso geringer, je kleiner das eingestellte Molekulargewicht ist.

Dextrane werden von vielen weiteren Bakterienstämmen gebildet, was zu einer großen Strukturvielfalt führt. Jeanes *et al.* untersuchten Dextrane aus 96 Bakterienstämmen (darunter v.a. *Leuconostoc* und *Streptococcus ssp.*)^[18]. Der Anteil von α -(1→6) Verknüpfungen variierte dabei zwischen 50 und 97 %. Zudem traten verschiedene Gehalte an α -(1→2), α -(1→3) und/oder α -(1→4) Verknüpfungen auf, die hauptsächlich an Verzweigungsstellen zu finden waren. Auch produziert ein einzelner Stamm mitunter verschiedene Varianten von Dextranen (z.B. *Leuconostoc citreum* NRRL B-742).

Die Molekulargewichte der Dextrane variieren im Bereich von $M_r = 5\text{-}500.000\text{ kDa}$ ^[7], je nach Art der Reaktionskontrolle bei der Fermentation beziehungsweise erfolgter Molekulargewichtseinstellung. Die Polydispersität ($M_w/M_n \geq 1$, Gewichtsmittel zu Zahlenmittel) der Produkte reicht von ca. 1,2 (GPC Standards) bis über 50 und nimmt mit dem Molekulargewicht zu. Unterhalb von $M_w = 2\text{ kDa}$ verhalten sich Dextrane in wässriger, niedrig konzentrierter Lösung wie Stäbchen^[7]. Ab einer bestimmten Konzentration kommt es zu einer Verschlaufung der einzelnen Ketten und damit zur Ausbildung eines Netzwerkes, was zu einem kompakteren Knäuel führt. Mit zunehmendem Molekulargewicht nimmt auch der Gyrationradius (Trägheitsradius, R_G) zu, welcher je nach Lösungsmittel und Konzentration zwischen 5 und 40 nm liegt. Lichtstreuexperimente und Viskositätsmessungen von Buchard *et al.* deuten auf eine hohe Dichte der Dextrane hin^[22]. Neuere Untersuchungen von Rolland-Sabaté *et al.* über Größenausschluss-Chromatographie (HPSEC, High Performance Size Exclusion Chromatography) mit anschließender Lichtstreuungsmessung (MALLS/QELS, Multi Angle Laser Light Scattering / Quasi Elastic Light Scattering) zeigen eine Zunahme der Verzweigung und der Dichte des Dextrans mit zunehmendem Molekulargewicht^[23]. Außerdem wandelt sich die Struktur mit zunehmendem M_w offenbar von einem Knäuel zu einer mehr kompakten, sphärischen Struktur.

1.3 Dextranderivate

Dextranester werden durch Reaktion der OH-Gruppen mit aktivierten organischen Säuren erhalten^[2,7]. Diese Derivate sind relativ säurelabil, zeigen jedoch interessante Eigenschaften wie z.B. Ausbildung von Nanopartikeln. Hierzu wird gerade in neuerer Zeit intensiv geforscht^[24]. Einige Beispiele von Dextranestern zeigt Abb. 1-4.

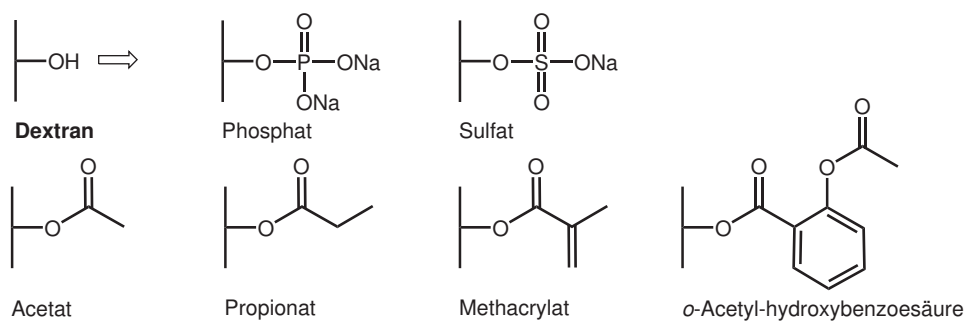


Abb. 1-4 Beispiele anorganischer und organischer Dextranester.

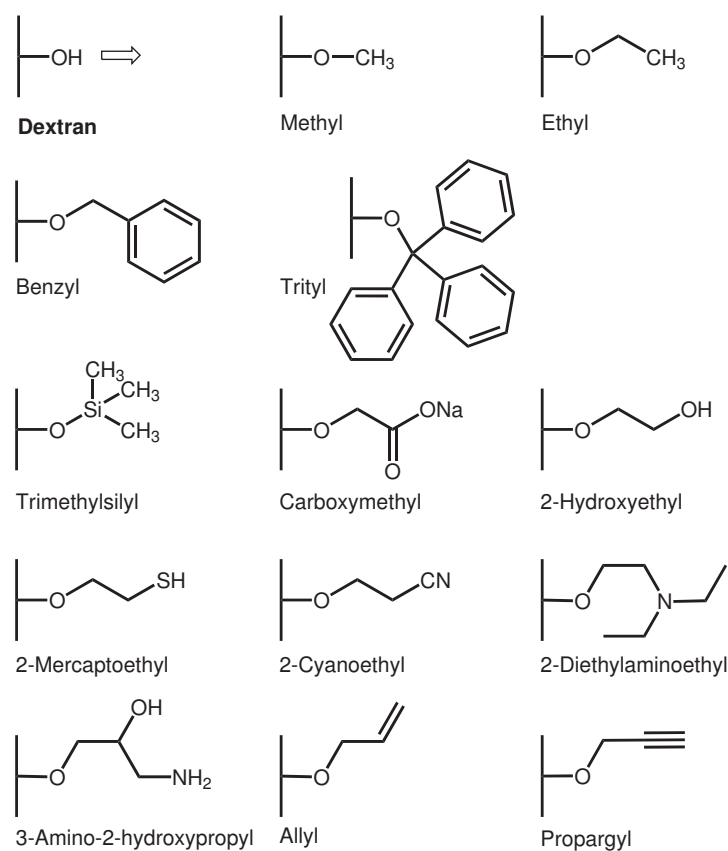


Abb. 1-5 Beispiele von Dextranethern.

Durch Veretherung der Hydroxygruppen erhält man chemisch stabilere Derivate des Dextrans^[7]. Je nach Substituent (siehe Abb. 1-5) können so verschiedene Substanzen mit veränderten physikochemischen Eigenschaften synthetisiert werden. So sind z.B. die Löslichkeit in organischen Lösemitteln und das hydrophile-lipophile Gleichgewicht einstellbar. Durch Einführung langer Alkylketten und hydrophiler Reste wie Hydroxyalkylgruppen und lipohiler, z.B. aromatischer Substituenten, erhält man

amphiphile Ether, welche emulgierende Eigenschaften zeigen. Auch die Ionenstärke oder die enzymatische Abbaubarkeit sind durch die Wahl der Substitution einstellbar. So sind z.B. ionische Derivate wie Carboxymethyldextrane und Diethylaminoethyldextrane deutlich langsamer abbaubar als natives Dextran.

Durch geeignete Wahl der Synthesebedingungen (z.B. ionische Flüssigkeiten) und Einstellung des Grades der Substitution können die physikochemischen Eigenschaften der Dextranderivate weiter modifiziert werden. Eine Übersicht über die Verwendung von Dextranen und ausgewählter Dextranderivate ist in Tab. 1-2 dargestellt.

Tab. 1-2: Verwendung von Dextranen und ausgewählten Dextranderivaten.

Dextran/-derivat	Einsatzgebiete
native Dextrane enge M_w –Verteilung Dextran	Blutersatzmittel ^[25] , Plasmaexpander ^[26] Standards für GPC ^[7] Radiologie oder Photographie als Zusatz zu lichtempfindlichen Schichten ^[26] , Kosmetik (Feuchtigkeitsspender) ^[7] , Lebensmittel (Backwaren ^[10] , gefrorene Milchprodukte) ^[7] [27,28] Pharmaprodukte (Konsistenzgeber und Feuchthaltemittel, künstliche Tränen, Augentropfen) ^[7] Oberflächenmodifikation für medizinische Anwendungen (verhindert Opsonisierung von Proteinen) ^[7]
Eisen-Dextran	Imferon [®] u. a., Behandlung von Eisenmangelanämien ^[8]
vernetzte Dextrane mit Epichlorhydrin vernetzt	Sephadex [®] : Gelfiltration, SEC, Debrisan TM : Wundverschluss ^[29] [8]
mit <i>N,N'</i> -Methylen-bisacrylamid vernetztes Allyldextran	Sephacryl [®] : Gelfiltration, SEC ^[30]
Dextranester Dextranphosphat Dextransulfat	Viskositäts-Regulator, immunstimulierend ^[7] Viskositäts-Regulator, Heparinersatz, (antikoagulierend), antiviral (HIV, Herpes), Kosmetik ^[7,8]
Dextranmethacrylate	Hydrogele, Papieradditive, Wundverschlüsse ^[7]

Dextran/-derivat	Einsatzgebiete
Dextranether	
Methyldextran	Aufklärung des Verzweigungsmusters von Dextranen ^[7]
Carboxymethyldextran (CMD)	Vorstufe für Heparinersatz, Stabilisierung von Eisenoxid-nanopartikeln, Oberflächenbeschichtung von Biosensoren, Hydrogele ^[7]
2-Diethylaminoethyl-dextran (DEAE)	cholesterinsenkend, Hilfsmittel bei Veterinärimpfstoff-Produktion, Protein-Stabilisierung ^[7] (PK-Chemicals)
amphiphile Dextranether Bsp. DexPEG ₁₀ C _n (Poly-ethylenglycol-alkyl-dextran)	Drug Delivery, Drug Carrier Systeme, Emulgatoren für Emulsionspolymerisation ^[7]
Dextrankonjugate	
fluoreszenzmarkierte Derivate	Untersuchung humanphysiologischer Prozesse ^[7]
Konjugate mit bioaktiven Substanzen	Arzneistoffe, Enzyme, Hormone, Antikörper ^[8]

1.4 Natürliche Aminopolysaccharide

Aminofunktionalisierte Polysaccharide sind in der Natur weit verbreitet und besitzen bemerkenswerte Eigenschaften. Für die hohe Funktionalität ist die Aminogruppe entscheidend. Aufgrund ihrer Polarität und des pH-abhängigen Polyelektrolytcharakters erhöht diese funktionelle Gruppe zum Beispiel die Wasserlöslichkeit der Polymere. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Substanzklasse gehören Chitosan, Hyaluronsäure und Heparin, welche im folgenden Abschnitt etwas genauer vorgestellt werden.

Chitin und Chitosan

Chitin (griechisch *chíton* = Kleid, Panzer) ist die Gerüstsubstanz des Exoskeletts von Wirbellosen wie Insekten oder Crustacea. Mindestens 10^{13} kg Chitin liegen konstant in der Biosphäre vor^[31], womit es nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer ist. Natives Chitin besitzt ein Molekulargewicht von mehr als 10.000 kDa, bei aus Garnelen erhaltenem **Chitosan** liegt es im Bereich von 440 kDa. Chitin besitzt aufgrund der Wasserstoffbrückenbindungen der Acetamidogruppen (siehe Abb. 1-6) eine hochgeordnete, kristalline Struktur und kommt in drei polymorphen Formen vor: α -, β - und

κ -Chitin, von denen die Struktur der α - und β -Form durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt ist. Im α -Chitin sind die Ketten antiparallel angeordnet. Es kommt in der Natur dort vor, wo besondere Härte benötigt wird. Die parallel angeordneten Ketten von β -Chitin sowie das κ -Chitin werden hingegen dort gefunden, wo eine Kombination von Flexibilität und Zähigkeit erforderlich ist. Makroskopisch äußert sich die supramolekulare Struktur von Chitin durch die Ausbildung von helixartigen Mikrofibrillen.

In vivo ist etwa jede zehnte AGU des Chitins über das Stickstoffatom einer Aminogruppe durch eine kovalente Amidbindung an Proteine gebunden. Der Degree of Deacetylation (DA) von isoliertem Chitin liegt bei etwa 0,10. Die bereits erwähnte Kristallinität verursacht eine extrem schlechte Wasserlöslichkeit des Polysaccharids. Erst ab einem Acetylierungsgrad von ca. 0,50 wird aufgrund der Salzbildung der entstandenen Aminogruppen eine Wasserlöslichkeit vermittelt. Erreicht der Acetylierungsgrad Werte von 0,40 und darunter, bezeichnet man diese wasserlöslichen Chitine als Chitosane (Abb. 1-6). Der Stickstoffgehalt dieser Polysaccharide liegt zwischen 5 und 8 %. Eine Deacetylierung wird durch die Behandlung mit konzentrierter NaOH Lösung (wässrig oder alkoholisch) vorgenommen. Der pK_a -Wert von Chitosan bewegt sich in Abhängigkeit von Temperatur und Medium im Bereich von 5,2-6,8^[32].

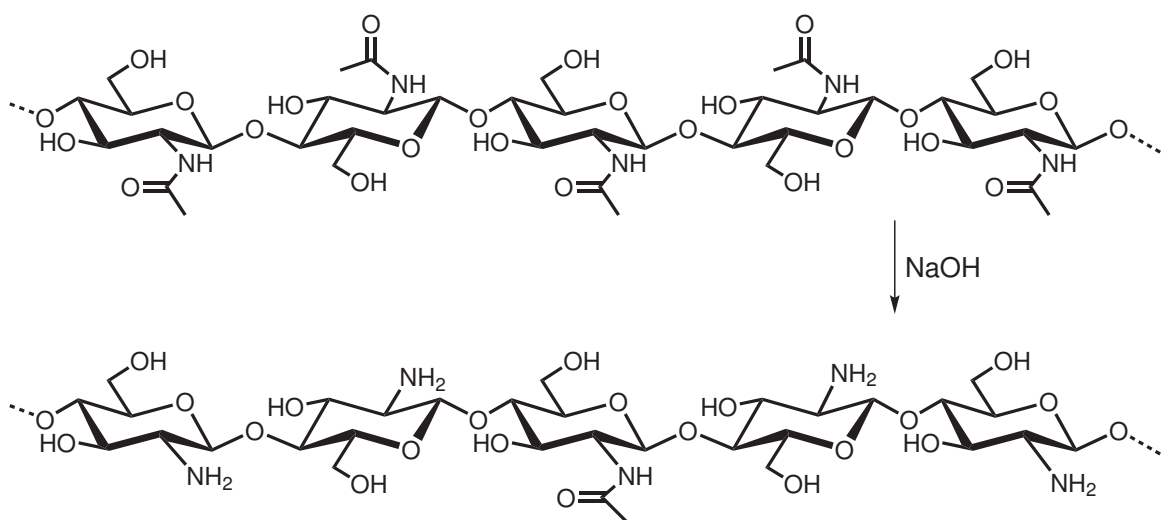


Abb. 1-6 Chemische Strukturen von Chitin (oben) und Chitosan (unten).

Chitin und Chitosan wurden und werden für eine Vielzahl von Anwendungen erprobt. Die Einsatz- und Forschungsgebiete lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen^[31,33]:

- Technische Anwendungen (Verspinnen zu Fasern, Färbung, Einlagerung löslicher Substanzen, funktionelle Kosmetikbestandteile)
- Biochemische und medizinische Einsatzgebiete (Blutverdünnung, Wundheilung, Wundauflagen, Knochenregeneration, Immunoadjuvans, künstliche Haut)
- Verhinderung von Biosynthesen (Insektizide)
- Enzymatik (Isolierung und Charakterisierung von Chitinasen)
- Einsatz als (Metall-)Komplexbildner (Katalysatorwirkung)
- Chemische Derivatisierungen (Kombination mit anderen natürlichen und synthetischen Polymeren, Grafting, Coatings)
- Einsatz von Chitosan in der Lebensmittelindustrie (Nahrungsergänzungsmittel: cholesterinsenkende Wirkung, Schlankheitsmittel, Konservierungsstoff: antimikrobielle Überzüge von Obst und Gemüse)

Die kontrollierte Funktionalisierung von Chitin erweitert das Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten noch beträchtlich^[34].

Glycosaminoglycane

Zu der Gruppe der Glycosyaminoglycane^[35] zählen viele Polysaccharide, die im lebenden Organismus eine wichtige Rolle für biologische Prozesse oder zur Stabilisierung von Strukturen, insbesondere von humanen Geweben, spielen.

Chondroitinsulfate sind Polymere mit einer molaren Masse von 20-50 kDa, die abwechselnd aus β -D-Glucuronsäure und *N*-Acetyl- β -D-galactosamin-4- oder -6-sulfat mit alternierenden 1,3- bzw. 1,4-glykosidischen Verknüpfungen zusammengesetzt sind (z.B. β -Heparin, Chondroitin-4-sulfat). Sie kommen gebunden in Proteoglykanen vor, welche zusammen mit **Hyaluronsäure** und Collagenen den Hauptbestandteil von Knorpel, Knochen und anderen Bindegeweben bilden und für die weiche Beschaffenheit der Gewebe sorgen. Hyaluronsäure (Abb. 1-7) ist eine hochmolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht zwischen 50 000 und mehreren Millionen Dalton. Grundbaustein des im Körper als Proteoglykan vorkommenden Polysaccharids ist ein aus D-Glucuronsäure und *N*-Acetyl-D-glucosamin in β -(1 \rightarrow 3)-glykosidischer Bindung aufgebautes Amino-

disaccharid, das mit der nächsten Einheit β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verbunden ist. Hyaluronsäure wird z.B. als Moisturizer für die Herstellung kosmetischer Mittel und zur Behandlung der Osteoarthritis verwendet.

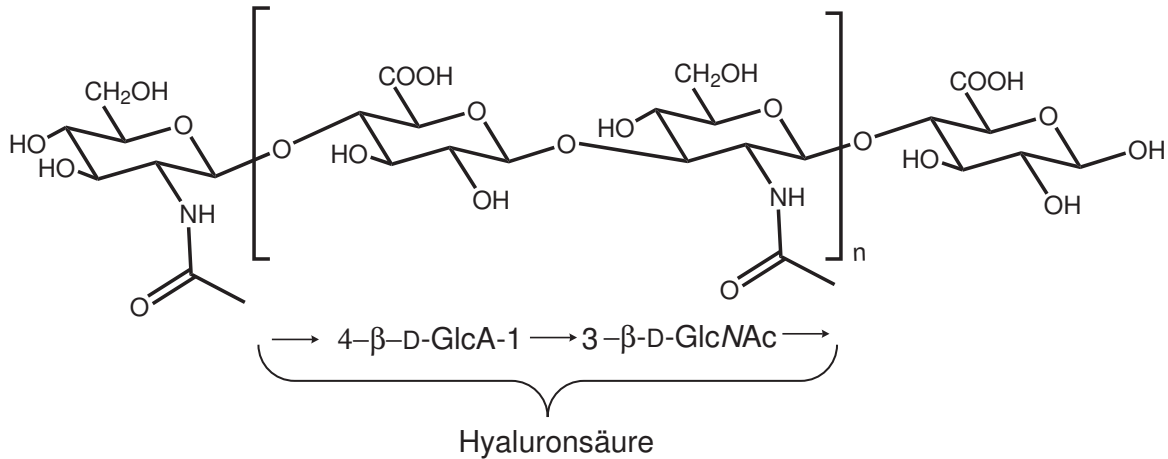


Abb. 1-7 Chemische Struktur der Hyaluronsäure.

Das hochsulfatierte Glykosaminoglycan **Heparin** (M_w 6-25 kDa) besteht aus D-Glucosamin und D-Glucuronsäure, die jeweils α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpft sind und die Heparin Untereinheiten bilden. Diese Untereinheiten sind miteinander ebenfalls α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch zum Heparin verknüpft. Einige der Glucuronsäure-Bausteine liegen an C-5 epimerisiert zu α -L-Iduronsäure vor und sind sulfatiert, wobei die Stellung und Menge der Sulfatgruppen mit 4-6 Sulfatgruppen je Tetrasaccharid variiert. Das an Proteine gebundene Heparin kommt nicht im Bindegewebe, sondern in den Granula der Mastzellen entlang der Arterienwände von Leber, Lunge, Thymus und Milz vor. Es ist ein natürliches Antikoagulans, das auch therapeutisch oder prophylaktisch gegen Thrombose eingesetzt wird. **Murein** ist die Stützsubstanz der Bakterien-Zellwände, das z.B. bei *Escherichia coli* aus alternierenden β -(1 \rightarrow 4)-verknüpften Einheiten von N-Acetyl-D-glucosamin und N-Acetylmuraminsäure besteht. Über Peptidketten sind die Polymerstränge zudem vernetzt.

1.5 Aminofunktionalisierung von Polysacchariden

In den letzten Jahrzehnten wuchs das Interesse der Wissenschaft und Wirtschaft, Polysaccharide und -derivate nicht nur als „Bulk“ Chemikalien einzusetzen, sondern vielmehr ihr Potenzial als Edukte für die Synthese hochspezialisierter Feinchemikalien zu nutzen. Facettenreiche Anwendungsfelder in Pharmazie (Drug delivery), Medizin

(Implantate) oder Analytik (Biosensoren) benötigen häufig modifizierte Biopolymere, weshalb deren Synthesemöglichkeiten intensiv erforscht wurden. Derivate mit funktionellen Gruppen wie z.B. Sulfat, Carboxy oder Amino sind daher von besonderem Interesse.

Aminofunktionalisierung unter partieller Zerstörung des Polysaccharidrückgrates

Aminopolysaccharide können über Periodatoxidation und anschließende reduktive Aminierung erhalten werden. Im ersten Schritt werden durch Diolspaltung innerhalb des Polysaccharids Aldehydgruppen erzeugt. Diese werden im zweiten Schritt unter Zusatz des entsprechenden Amins (HNR_2) zur Schiff'schen Base umgesetzt und durch ein geeignetes Reduktionsmittel (z.B. NaBH_4 oder NaCNBH_3) reduziert (siehe Abb. 1-8)^[7,36].

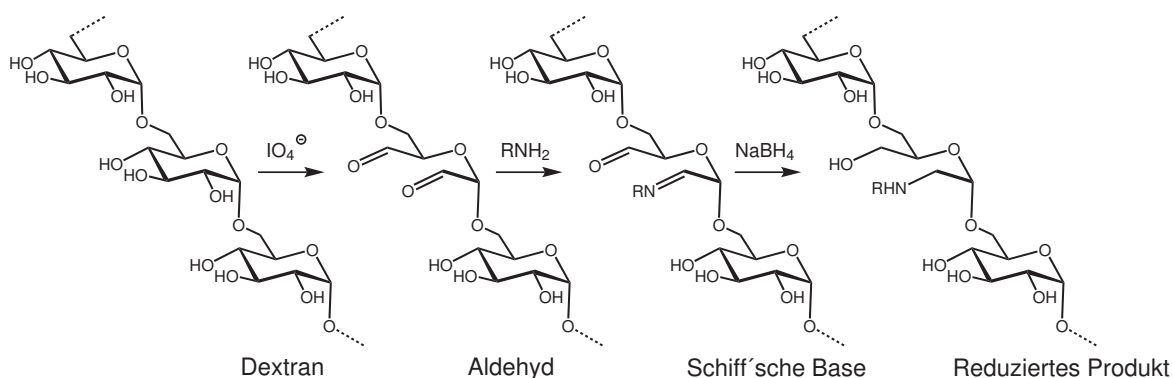


Abb. 1-8: Synthese von Aminodextran durch partielle Periodatoxidation und reduktive Aminierung^[7].

Piehler *et al.* synthetisierten auf diese Weise Aminodextran mit NaIO_4 und $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NaCNBH}_3$ ^[36], welches erfolgreich für die Beschichtung von Glasoberflächen und die Anbindung von Signalmolekülen eingesetzt wurde.

Durch die beschriebene Derivatisierung wird jedoch die Integrität des Polysaccharidrückgrats aufgehoben, was die Säurelabilität durch Verlust der cyclischen Acetalstruktur deutlich erhöht. Die Aminogruppen sitzen zudem unmittelbar im Polymer, sind folglich wenig flexibel bzw. haben durch das Fehlen eines Spacers nur eine geringe Reichweite. Bei einer Veretherung der OH-Gruppen in einer polymeranalogen Reaktion bleibt das Polysaccharidgerüst mit seinen hydrophilen Eigenschaften hingegen intakt. Lediglich die Hydroxylfunktionalitäten werden durch Aminogruppen mit Alkyl-Spacern verschiedener Länge substituiert.

Aminofunktionalisierungen unter Erhalt des Polysaccharidrückgrates

Direkte Alkylierung

Der vermeintlich einfachste Weg zu Aminopolysacchariden scheint die Umsetzung mit aminogruppenhaltigen Reagenzien wie z.B. 3-Chlorpropylamin zu sein. Aufgrund der höheren Nucleophilie der eingeführten Aminogruppen im Vergleich zu den Hydroxylfunktionalitäten des Polysaccharids, erhält man jedoch keine definierten Produkte, sondern aufgrund von Tandemsubstitutionen ein undefiniertes Gemisch aus Polyaminoderivaten (siehe Abb. 1-9).

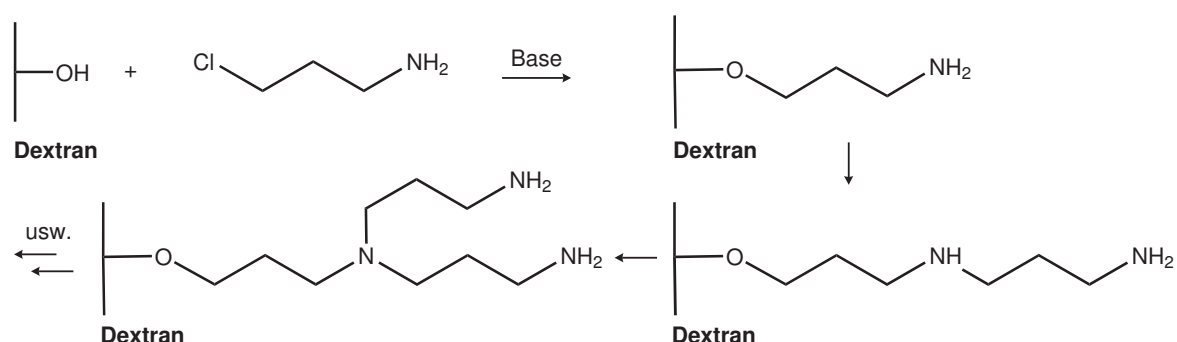


Abb. 1-9 Direkte Alkylierung von Dextran mit 3-Chlorpropan und mögliche Nebenreaktionen.

Kerr *et al.* versuchten bereits 1952, *O*-Aminoethylstärke durch die Umsetzung des Polysaccharids mit Aziridin (Ethylenimin) herzustellen (Abb. 1-10)^[37]. Ein großer Nachteil dieses Syntheseweges ist die Bildung von Polyethylenimin, Hydroxyethylenimin und erneut das Auftreten von Tandemreaktionen an den Aminogruppen

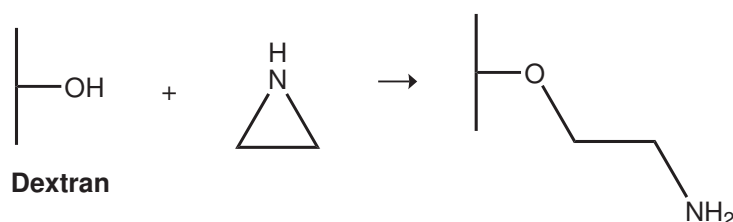


Abb. 1-10 Direkte Alkylierung von Dextran mit Ethylenimin.

Einführung von Stickstoff über Intermediate

Eine andere Strategie der Aminofunktionalisierung ist die Einführung von Stickstoff in mehreren Schritten über reaktive Intermediate. Ein Beispiel hierfür ist die Aminomodifizierung von Cellulose über die Reaktion von *O*-Tosylcellulosederivaten mit verschiedenen aliphatischen oder aromatischen Diaminen, welche u. a. von Rieseler *et al.* beschrieben wurde^[38]. Zur Lösungsvermittlung wurden die Tosylgruppen an C-3 und C-2 zu Acetaten, Benzoaten oder Carbanilaten umgesetzt und anschließend die verbliebenen C-6-OTs Gruppen mit den Diaminen zur Reaktion gebracht (siehe Abb. 1-11). Die erhaltenen Aminocellulosen wurden erfolgreich zur Beschichtung von Glasoberflächen und Enzymanbindung für Biosensoren eingesetzt^[38].

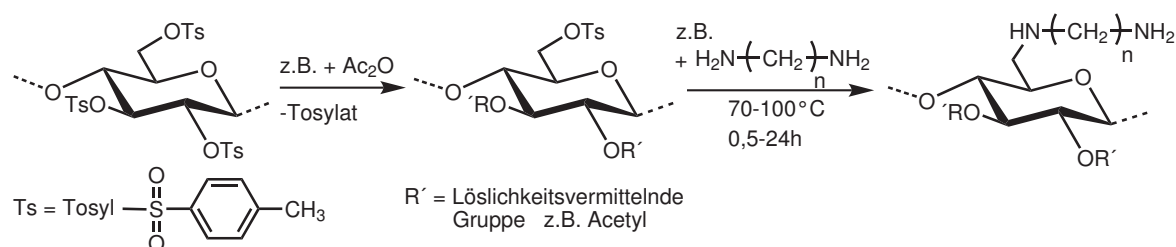


Abb. 1-11 Aminomodifizierung von Cellulose über $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion von 6-*O*-Tosylcellulose mit aliphatischen oder aromatischen Diaminen.^[38]

Einführung stickstoffhaltiger Schutzgruppen und Entschützung zum Amin

Eine Möglichkeit um die in Abb. 1-9 gezeigten Nebenreaktionen zu vermeiden, ist Stickstoff in einer geschützten Form einzuführen. Problematisch bei der Anwendung auf Polysaccharide sind die mitunter harten Bedingungen, mit denen die Schutzgruppen wieder entfernt werden, da diese stark sauren oder alkalischen Bedingungen ebenso für einen unerwünschten hydrolytischen Abbau sorgen können. Zudem ist es erforderlich ein Lösungsmittel zu finden, in welchem sich das polare Polysaccharid und das unpolare Reagenz kombinieren lassen. Beispiele für typische *N*-Schutzgruppen sind *tert*.-Butylcarbammat (*N*-BOC), 9-Fluorenylmethylcarbammat (*N*-Fmoc), Benzylcarbammat (*N*-Z) oder Phthalimide (siehe Abb. 1-12).

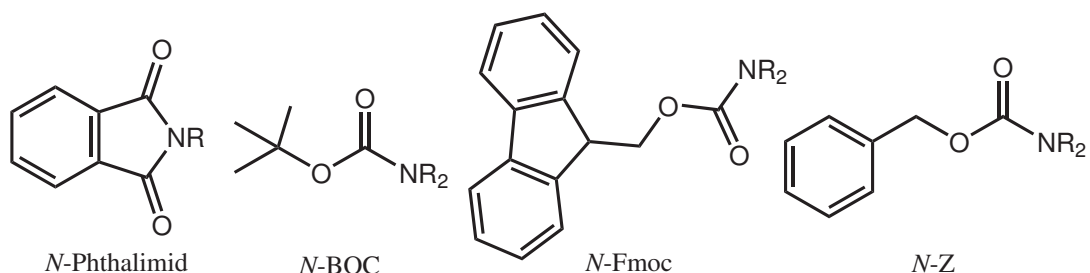
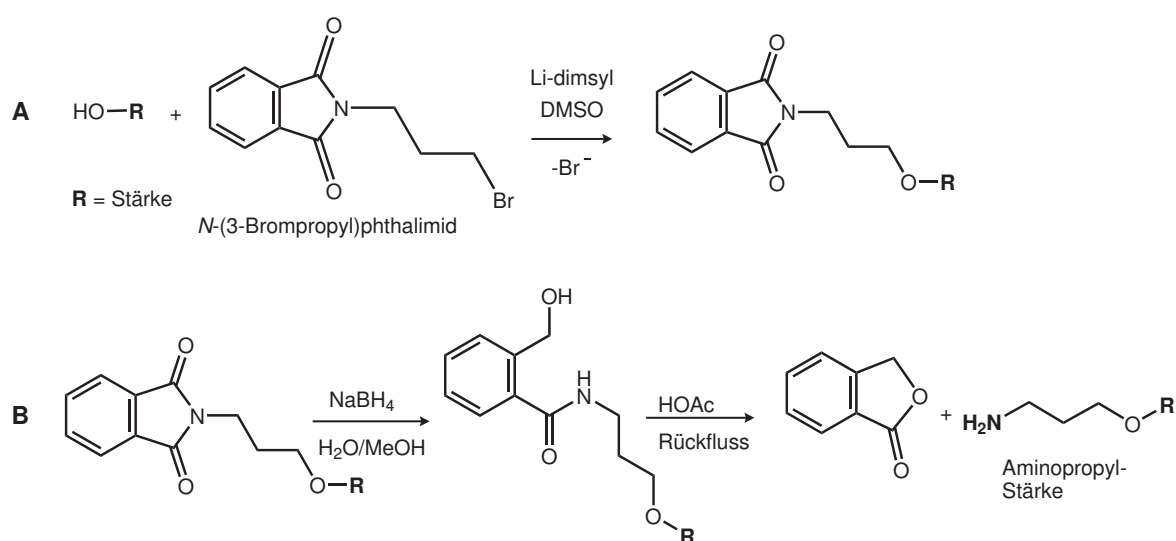


Abb. 1-12 Übersicht über mögliche N-Schutzgruppen.

Die Abspaltung von *N*-BOC und *N*-Z erfolgt jedoch unter sauren Bedingungen (HCl, H₂SO₄, oder TMSOTf) und ist daher für die Derivatisierung von Polysacchariden eher ungeeignet. *N*-Fmoc kann durch β -Eliminierung mit milden Aminbasen wie Piperidin oder Morpholin entschützt werden, jedoch würde dieses bereits bei der alkalischen Alkylierung des Polysaccharids mit dem Reagenz geschehen, weshalb auch diese Schutzgruppe ungeeignet ist. *N*-substituierte Phthalimide sind in der Aminosäuresynthese etabliert und wurden 1887 von Gabriel entwickelt. Für die Herstellung von Kohlenhydratderivaten wurden auf diese Weise bereits verschiedene Versuche unternommen^[39-43]. Gonera *et al.* untersuchten die Synthese von Aminopropylstärke und -amylose mit verschiedenen *N*-Brom-alkylphthalimiden^[42,43]. Die quantitative Entschützung des Phthalimids zum primären Amin gelang mittels Natriumborhydrid in Wasser/Methanol und anschließender Essigsäurehydrolyse des Amids unter Freisetzung von *o*-Hydroxymethylbenzoesäurelacton (Abb. 1-13)^[43].

Abb. 1-13 **A:** Umsetzung von Stärke mit *N*-(3-Brompropyl)phthalimid. **B:** Entschützung zur Aminopropylstärke durch NaBH₄^[43].

Einige der Aminopropylstärken und -amylosen erwiesen sich im Labormaßstab erfolgreich als Papieradditiv (Erhöhung der Nassfestigkeit), als Implantatbeschichtung^[44] sowie als Enzymstabilisatoren^[45].

Stickstoffeinführung in einer höheren Oxidationsstufe mit nachfolgender Reduktion

Eine weitere Möglichkeit, die genannten Nebenreaktionen der ungeschützten Amine zu umgehen, ist deren Einführung in einer höheren Oxidationsstufe und die nachfolgende Reduktion zum primären Amin. Hierzu bieten sich verschiedene Möglichkeiten an.

Liu *et al.* substituierten 6-*O*-Tosyl-Cellulose mit Natriumazid in DMSO zu 6-Azido-6-deoxycellulose^[46]. Eine vollständige Reduktion des Azids zur Aminogruppe wurde mit LiAlH₄ erreicht. Michaelis und Heinze konnten diese Strategie erfolgreich auf Dextrane übertragen^[47] (siehe Abb. 1-14). Hanessian *et al.* gelang die Überführung von Cyclodextrin-Aziden mit PPh₃ zu den korrespondierenden Aminoderivaten^[48].

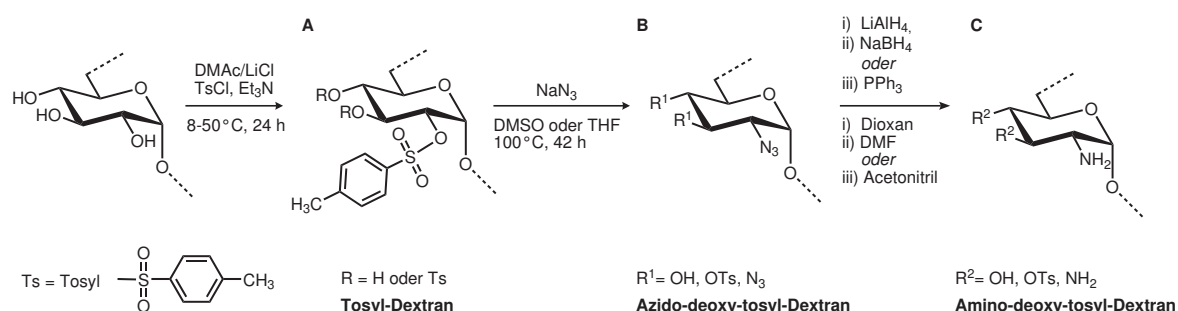


Abb. 1-14 **A:** Synthese von Tosyl-Dextran. **B:** Nucleophile Substitution zum Azidodextran. **C:** Reduktion zum Aminodeoxydextran^[47]

Eine weitere Möglichkeit der Stickstoffeinführung ist über die Nitrogruppe gegeben. Heeres *et al.* synthetisierten 2-Nitropropylstärke^[49] und reduzierten diese mittels katalytischer Hydrierung mit *Raney*-Nickel als Katalysator, mit Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) und einer Kombination aus $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ und NaBH_4 . Eine vollständige Reduktion zum Amin konnte jedoch nicht erreicht werden. Vielmehr trat ein Verlust an Substituenten auf und es kam aufgrund der Hydrolyse der intermediären Oxime oder Imine zu diversen Nebenreaktionen, was zu einem unübersichtlichen Produktgemisch führte.

Die Substitution mit Cyanoethylgruppen (CE) über eine *Michael*-Addition von Acrylnitril erwies sich in verschiedenen Arbeiten als gangbarer Weg, um Stickstoff in einer höheren

Oxidationsstufe in Polysaccharide einzuführen. Gianni *et al.* synthetisierten Cyanoethyl-Scleroglucane in wässriger Natronlauge^[50]. Daly *et al.* reduzierten CE-Cellulose zum Aminopropylderivat und nutzten Acrylnitril dabei als Lösungsmittel^[51].

Verraest *et al.* beschrieben die Synthese von CE-Inulinen und die Reduktion zu den entsprechenden Aminopropylderivaten mit NaBH₄/Cobaltborid^[52-54].

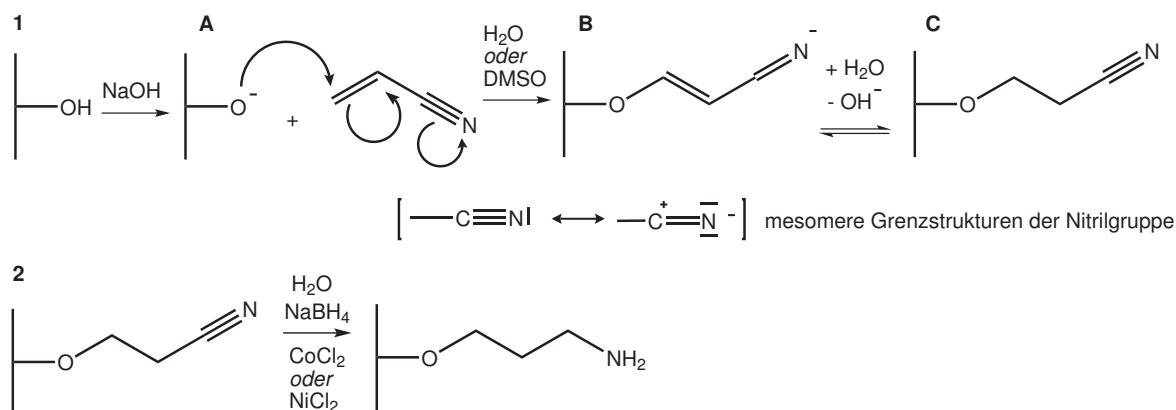


Abb. 1-15 Synthese von Cyanoethylpolysacchariden und ihre Reduktion zum Aminopropylderivat

Gonera *et al.* gelang die Synthese von Aminopropylstärke und -amylose über den genannten Weg^[43]. Cuber stellte im Rahmen ihrer Diplomarbeit^[55] auf diese Weise Cyanoethyl- und Aminopropyldextrane her.

Alkinylether als reaktive Intermediate

Alkinylether haben sich als reaktive Intermediate bewährt. Durch Reaktion mit Base und Elektrophilen können verschiedenste Derivate wie Alkohole, Aldehyde oder Carbonsäuren erhalten werden (siehe Abb. 1-16). Durch Mannich-Reaktion der Alkinylether mit Diethylamin/Formaldehyd erhält man aminofunktionalisierte Derivate, die allerdings im Ergebnis tertiäre Diethylamine hervorbringen. Durch Reaktion mit Dibenzylamin und anschließender Hydrierung der Benzylgruppen sind auf diese Weise auch primäre Amine zugänglich^[56].

Tankam *et al.* zeigten verschiedene Möglichkeiten der Funktionalisierung von terminalen Alkinen anhand der Modellsubstanz Methyl-2,3-di-*O*-propargyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid^[57] sowie Propargylstärke^[58,59]. Besonders interessant ist die Alkynylchemie in Hinblick auf Durchführung einer Kupfer(I)-katalysierten Reaktion durch Kopplung mit Aziden zu 1,2,3-Triazolen. Diese sogenannte „Click-Chemie“ findet derzeit große Beachtung als atomeffiziente Reaktion (siehe Abb. 1-16). De Geest *et al.* synthetisierten

Dextran-Alkylcarbonatester und ließen diese mit Dextran-Azidopropylcarbonaten in einer Click-Reaktion reagieren^[60]. Auf diese Weise stellten sie bioabbaubare Hydrogel-Mikrokapseln her. Tahir *et al.* synthetisierten Dextran-*O*-propargyl- und Dextran-*O*-pentinyl-ether und setzten sie erfolgreich zur Immobilisierung von Enzymen (Lipase) und somit als Biokatalysator ein^[61].

Die Einführung von Aminogruppen über die Funktionalisierung der homologen, einfach ungesättigten Allylether von Kohlenhydraten, ist Ziel der vorliegenden Arbeit und wird daher ausführlich in Kapitel 3 diskutiert.

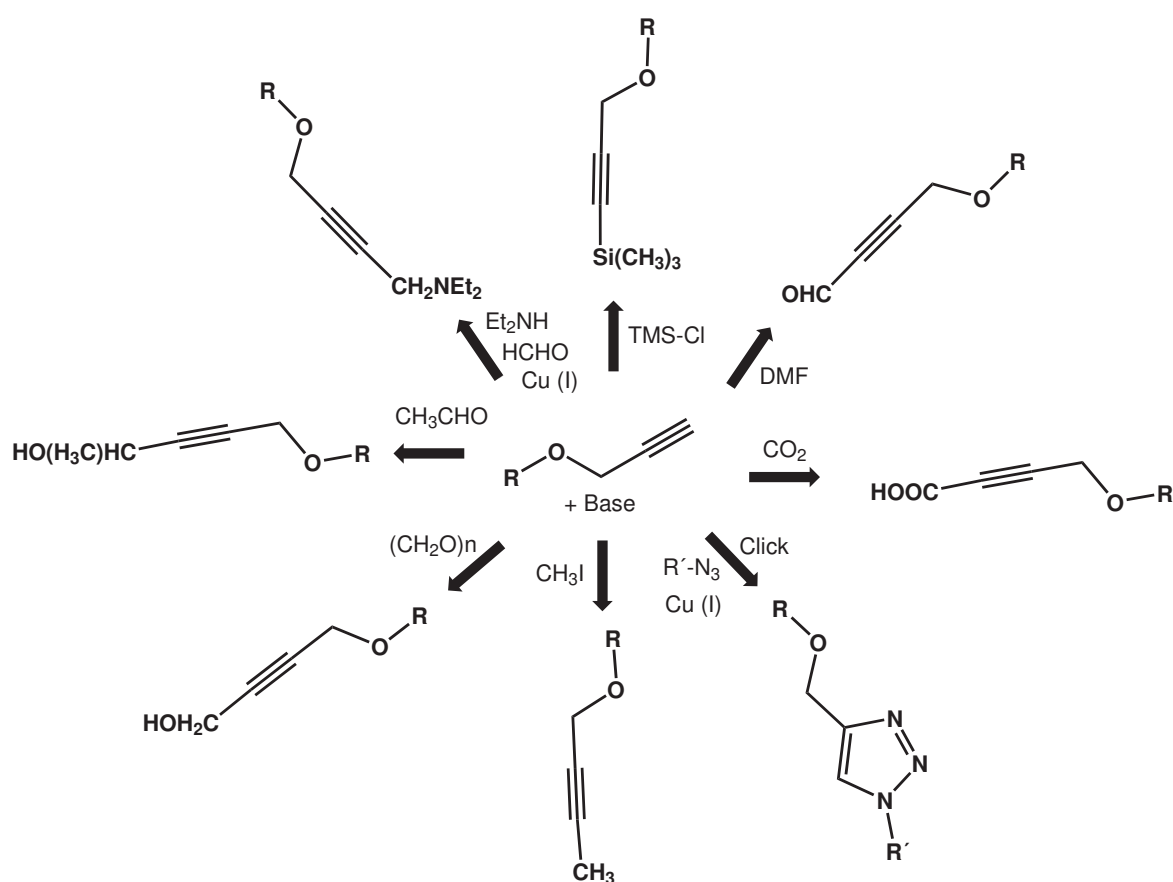


Abb. 1-16 Übersicht über die Funktionalisierung von Propargylethern.

1.6 Magnetische Nanopartikel

Magnetische Nanopartikel sind von großem Interesse für die unterschiedlichsten Forschungsbereiche wie z.B. Katalyse, Biotechnologie, Biomedizin, Bildgebung durch Kernresonanz, Datenspeicherung oder Altlastensanierung^[62]. Es existieren mehrere

geeignete Methoden zur Synthese magnetischer Nanopartikel unterschiedlicher Zusammensetzung, allerdings hängt die erfolgreiche Anwendung der Partikel in den genannten Bereichen stark von deren Stabilität unter den herrschenden Bedingungen ab. Die Partikelgröße liegt typischerweise zwischen 10 und 20 nm, bei welcher jedes Nanopartikel zu einer einzelnen magnetischen Domäne wird und ab einer bestimmten Temperatur superparamagnetisches Verhalten zeigt. Die Partikel haben ein großes konstantes magnetisches Moment und reagieren schnell auf ein von außen angelegtes Magnetfeld. Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel besitzen unterschiedliche stöchiometrische Zusammensetzung. Hierzu zählen $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Maghemit) und Fe_3O_4 (Magnetit), welche unterhalb einer bestimmten Größe ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$: 166 nm, Fe_3O_4 : 128 nm) superparamagnetisch sind^[63].

Ein inhärentes Problem ist die Instabilität der Nanopartikel, die aus energetischen Gründen dazu neigen, das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen durch Agglomeration zu verringern. „Nackte“ metallische Nanopartikel sind zudem chemisch hochaktiv und oxidationsempfindlich. Für viele Anwendungen ist daher eine äußere Schutzhülle notwendig. Hierzu eignen sich u.a. organische Verbindungen wie Tenside, synthetische Polymere wie Polypyrrole, Polyaniline, Polyester oder Polyalkylcyanacrylate, aber auch Biopolymere wie Dextrane. Neben der Stabilisierung kann über diese Schichten eine Funktionalisierung der Nanopartikel erfolgen. Auf diese Weise können über funktionelle Gruppen Signalmoleküle wie z.B. Enzyme oder Antikörper angebunden werden. Die Isolierung von Molekülen aufgrund der magnetischen Eigenschaften der Partikel ist ein mögliches Einsatzgebiet. Auch die Veränderung der Magnetisierbarkeit durch Belegung der Oberfläche kann analytisch genutzt werden (siehe Abb. 1-17).

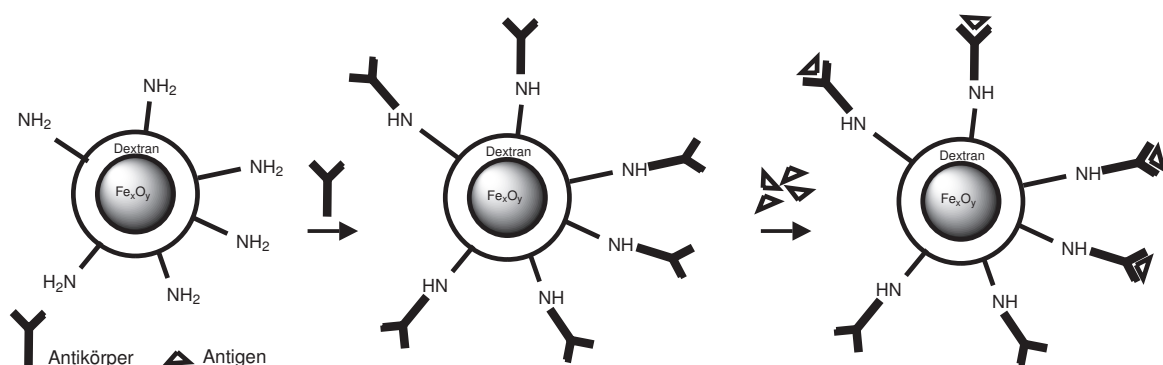


Abb. 1-17 Anbindung von Antikörpern an magnetische Eisenoxid-Aminodextran-Nanopartikel und Belegung mit Antigenen (Analyt).

Eine Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten der Synthese von Nanopartikeln zeigt Tab. 1-3. Häufig sind die Einstellung der Größenverteilung und der Erhalt monodisperser Partikel jedoch problematisch. Kommerziell erhältlich (z.B. ChemiCell GmbH, Berlin) sind derzeit Eisenoxidnanopartikel mit Kohlenhydrat-Beschichtungen u.a. aus Stärke, Diethylaminoethyl-Stärke, Stärkephosphat, Dextran, Dextransulfat und Carboxymethyldextran.

Tab. 1-3: Übersicht über die Synthesemöglichkeiten von magnetischen Nanopartikeln^[62].

Methode	Synthesebedingungen	Coating-Bildner	Größenverteilung	Formkontrolle	Ausbeute
Mitfällung, (Copräzipitation)	einfach, 20-90 °C, einige Minuten, Wasser	vor oder nach Reaktion zugegeben	relativ eng	nicht gut	hoch
Thermische Zersetzung z.B. Fe(acac) ₃	Inertgasatmosphäre, 100-320 °C, Stunden bis Tage, org. Lösungsmittel	während Reaktion zugegeben	sehr eng	sehr gut	hoch
Mikroemulsion	schwierig, 20-50 °C, Stunden, org. Lösungsmittel	während Reaktion zugegeben	relativ eng	gut	niedrig
Hydrothermal-synthese	einfach (hoher Druck), 220 °C, Stunden bis Tage, Wasser/EtOH	während Reaktion zugegeben	sehr eng	sehr gut	mittel

Mit Aminodextranen beschichtete magnetische Eisenoxid-Nanopartikel sollten für die genannten Zwecke der Anbindung biologischer Signalmoleküle ebenfalls geeignete Kandidaten sein. In der vorliegenden Arbeit wurden Vorversuche zur Synthese dieser Nanopartikel durch Copräzipitation durchgeführt und in Kooperation mit dem Institut für elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der TU Braunschweig mittels Magnetrelaxation (MRX)^[64] untersucht (siehe Kapitel 8).

2 Zielsetzung

Oberflächenfunktionalisierung spielt im Bereich biomedizinischer und bioanalytischer Anwendungen eine bedeutende Rolle. Polysaccharidhydrogele mit geeigneten funktionellen Gruppen können kovalent an aktivierte Oberflächen gebunden werden, unspezifische Proteinadsorption verhindern, eine für Bioreaktionen in Fließsystemen geeignete dreidimensionale Umgebung strukturieren, funktionelle Gruppen für die Bindung von Rezeptoren auf der Oberfläche verankern oder selbst gleichzeitig Erkennungsstrukturen liefern. Aminofunktionalisierte Polysaccharide sollten diese Anforderungen sehr gut erfüllen können.

Die Veretherung der Hydroxygruppen der Polysaccharide kann in einer polymeranalogen Reaktion durchgeführt werden. Jedoch können aminogruppenhaltige Reagenzien wegen ihrer im Vergleich zu den Kohlenhydrat-OH höheren Nucleophilie nicht ungeschützt mit dem Polysaccharid umgesetzt werden, sofern man definierte Produkte erhalten möchte. In der vorliegenden Arbeit wird daher die Strategie der Einführung von *O*-Alkenylethern als reaktive Intermediate und deren weitere Funktionalisierung zu Aminogruppen verfolgt. Unter Erhalt des Polysaccharidgerüsts wird so ein bestimmtes primäres Substitutionsmuster eines Spacers wählbarer Länge erhalten. Die Doppelbindungen können in einer Folgereaktion unabhängig und entkoppelt vom Polymerrückgrat vielfältig, u.a. zur Aminogruppe, umgesetzt werden.

Als Polysaccharid wird das Homopolymer Dextran eingesetzt. Dieses ist in verschiedenen Molekulargewichten mit engen Verteilungen kommerziell erhältlich und überzeugt durch seine regelmäßige Struktur, seine Biokompatibilität und seine gute Löslichkeit in Wasser oder Dimethylsulfoxid.

Bei der Modifizierung von Polysacchariden durch polymeranaloge Reaktionen erhält man komplexe Produktgemische, sofern die OH-Gruppen nicht vollständig umgesetzt wurden. Diese Gemische lassen sich nur schwer aufarbeiten und charakterisieren. Um die prinzipielle Durchführbarkeit der ausgewählten Alkenylfunktionalisierung an Kohlenhydratderivaten zu studieren, werden zunächst Untersuchungen an der voll geschützten Monomereinheit des Dextrans, dem Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden-

α -D-glucopyranosid, durchgeführt. Aufbauend auf den so gewonnenen Erkenntnissen werden erfolgversprechende Reaktionen auf Alkenyldextrane übertragen.

Die Charakterisierung der funktionalisierten Glucane hinsichtlich ihrer Substituentenverteilung auf den verschiedenen strukturellen Ebenen eines Polysaccharids ist ein weiteres Ziel der Arbeit. Die dargestellten Substanzen sollen zudem mit Kooperationspartnern hinsichtlich ihrer Eignung für die genannten Anwendungen, insbesondere die Beschichtung von magnetischen Nanopartikeln, untersucht werden.

3 Alkenylgruppen als strategische Intermediate

Im folgenden Abschnitt soll ein Überblick über den Stand der Forschung zu verschiedenen Synthesen, Derivaten und Einsatzmöglichkeiten der Allylgruppe als Ether oder Glykosid, als Schutzgruppe oder reaktives Intermediat in der Kohlenhydratchemie gegeben werden. Das mannigfaltige Potential der Alkenylderivate für ionische und radikalische Additionen, oxidative Spaltungen oder Polymerisationssubstrate für Cycloadditionen soll auf diese Weise aufgezeigt werden.

3.1 Synthese und Einsatzmöglichkeiten von Kohlenhydrat-Alkenylethern und Alkenylglykosiden

Bereits im Jahr 1923 berichteten Tomecko und Adams^[65] über die Synthese von Allylethern diverser Kohlenhydrate. Neben Glucose und Saccharose setzten sie auch diverse Polysaccharide wie Inulin, Stärke und Cellulose mit Allylbromid und NaOH zu ihren Allylethern um. Im Folgenden soll ein Überblick über den Stand der Forschung gegeben werden.

Alkenylmono- und disaccharide

Nach den ersten Arbeiten von Tomecko und Adams^[65] erfuhren die Allylether niedermolekularer Zucker in den 1945er Jahren eine intensive Bearbeitung durch die US-amerikanische Arbeitsgruppe um Yanovsky. In einer Serie von Publikationen^[66-70] berichteten sie u. a. von der *O*-Allylierung des α -Methylglucosids, der Zuckeralkohole Sorbit, Mannit, Xylit, Arabit, Dulcit, Talit und Idit sowie von Galactose und Saccharose. Sie untersuchten vorwiegend die Eigenschaften der erhaltenen Produkte, ihr Oxidations- und Polymerisationsverhalten sowie mögliche Nebenprodukte.

Dubber *et al.* nutzten Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-allyl- α,β -D-glucopyranosid (Abb. 3-1) als Coremolekül zur Synthese von Dendrimeren und Glykoklustern^[71,72]. Diverse Allylglykoside niedermolekularer Zucker dienen als Zwischenprodukte und Bausteine für Glykosylierungen.

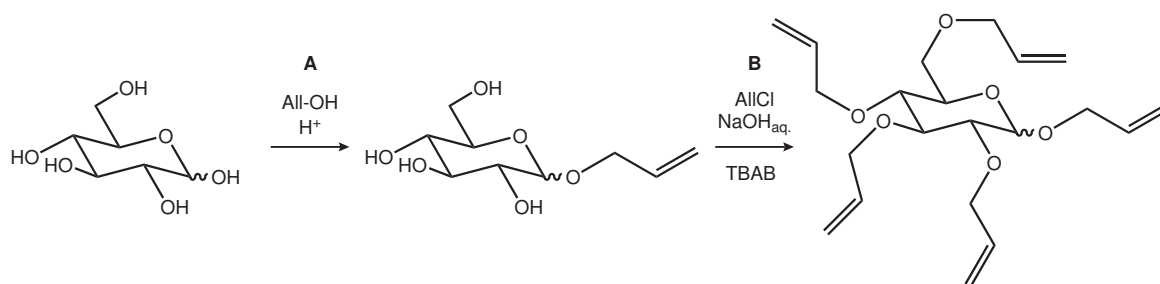


Abb. 3-1 Synthese von Allyl-2,3,4,6-tetra-*O*-allyl- α,β -D-glucopyranosid. A: Synthese des Allylglucosids, B: Veretherung der OH-Gruppen (nach^[71]). TBAB = Tetrabutylammoniumbromid.

Alkenyloligosaccharide und Alkenylcyclodextrine

Im Bereich der Oligosaccharide sind vor allem die Allylether der Dextrine^[65], insbesondere der Cyclodextrine (Abb. 3-2) interessant. Ihre Synthese erfolgt zumeist in DMF mit NaH als Base und Allylbromid als Reagenz^[73,74]. Allylcyclodextrine dienen häufig als Zwischenprodukt mit einer nachfolgenden Funktionalisierung ihrer Allylgruppen^[48,73-76] und werden so auch zum Aufbau größerer Dendrimere und Glykokluster^[77,78] genutzt. Die erhaltenen Produkte sind für verschiedene Anwendungen interessant: polyanionische Cyclodextrinderivate besitzen Potenzial als HIV-1-Inhibitoren^[76], andere Derivate dienen als Katalysatoren und Einschlussverbindungen für vielfältige analytische und medizinische Zwecke^[48].

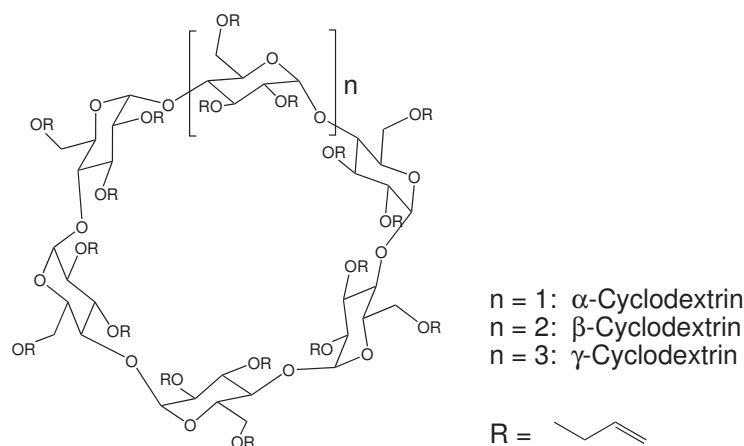


Abb. 3-2 Struktur der α -, β - und γ -*O*-Allylcyclodextrine

Beim Aufbau blockartiger 1,4-Glucane aus Cyclodextrinderivaten erwiesen sich Allylether als vielversprechende Bausteine^[3,79]. Nach erfolgter Öffnung des Cyclodextrins mit nachfolgender Polymerisation kann diese Schutzgruppe selektiv gespalten werden und man

erhält im Idealfall je nach eingesetztem Cyclodextrin (α , β , γ) eine eingebaute Folge aus (mindestens) 6 bis 8 unsubstituierten Glucosebausteinen. Auf diese Weise können längere Sequenzen an unsubstituierten Abschnitten in ein Polyglucan eingefügt werden, so dass blockartig substituierte Polysaccharide entstehen, die als Modellsubstanzen z.B. für Struktur-Eigenschaftsuntersuchungen dienen können. Alternativ können durch eine sich anschließende Funktionalisierung der Allylgruppen vielfältige, blockartig substituierte Polymere erhalten werden.

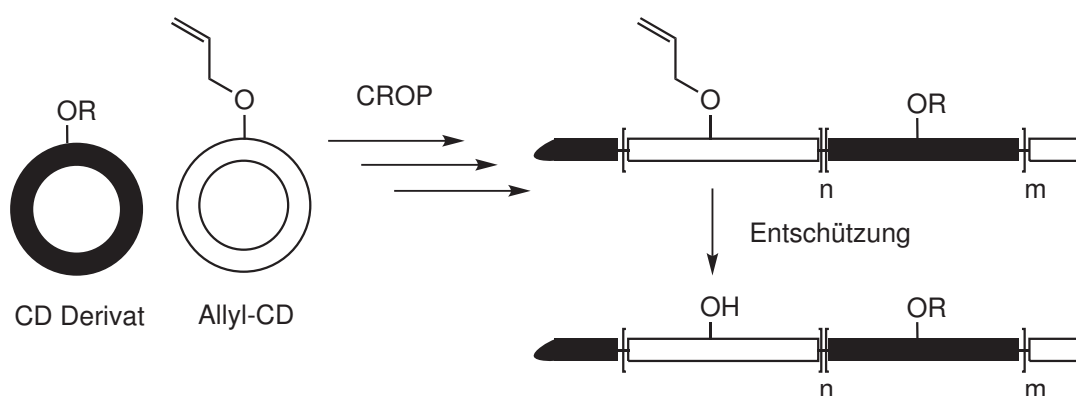


Abb. 3-3 Kationische ringöffnende Polymerisation (CROP) von Allylcyclodextrinen und ihre anschließende Entschützung zum Alkohol^[80]

Alkenylpolysaccharide

Auch auf Polysaccharidebene waren es wie schon erwähnt Tomecko und Adams, die 1923 als erste von der synthetischen Herstellung verschiedener Allylpolysaccharide, namentlich Allylstärke, Allylinulin und Allylcellulose berichteten^[65].

Von kommerzieller Bedeutung ist heutzutage **Allylstärke**, welche in vernetzter Form als Bindemittel bei der Erzeugung von Wellpappe verwendet wird^[81]. Frühe Publikationen beschäftigen sich neben der Optimierung der Synthesebedingungen^[65,82-84] vor allem mit der Stabilität, der Oxidationsbeständigkeit sowie Vernetzung^[85] der erhaltenen Derivate. Die Synthese der Allylstärke erfolgte dabei zumeist in hoch konzentrierter wässriger Alkalilauge mit Allylbromid oder Allylchlorid^[65,82,83], wobei Allylsubstitutionsgrade (DS_{allyl} , Definition DS siehe Kapitel 5) bis 1,81 erhalten werden konnten. Neben homogenen Allylstärken sind auch gemischte Ether bekannt. Stärkeether mit Alkylresten verschiedener Länge (C_2 bis C_7 , C_{12}) wurden hierzu in einem zweiten Schritt vollständig allyliert und die Löslichkeiten sowie Vernetzungscharakteristika untersucht^[86]. In neuerer Zeit lag der Fokus auf Copolymerisationen. Die aus der Reaktion von Allylstärke (DS_{allyl}

0,21 bis 0,50) mit Methacrylsäure und Acrylamid erhaltenen Hydrogele zeigten ein gutes Quellverhalten und waren enzymatisch abbaubar^[87].

Viele Cellulosederivate, insbesondere Celluloseether, werden heute in großindustriellem Maßstab produziert und finden in den unterschiedlichsten Bereichen Verwendung (siehe Kapitel 1.1). Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch das Potenzial der **Allylcellulose** intensiv erforscht wurde und wird. Nach der Publikation von Tomecko und Adams^[65] war es Sakurada, der 1929 weitere Untersuchungen über den noch neuen Celluloseether anstellte^[88]. Die Synthese mit Allylbromid in Natronlauge führte zu einem überraschend hohen Substitutionsgrad von annähernd 3,0. Zur Analytik der Produkte (siehe auch Kapitel 5) wurde die Halogenzahl (Brom und Iod) bestimmt. Das erste Patent über ein „Verfahren zur Herstellung von Celluloseallyläthern“ wurde 1958 erteilt^[89]. Die geschützte Methode beruht auf der Überführung von Cellulose mit Alkali und Kupferhydroxid in Kupferalkalicellulose und der Reaktion dieser mit Allylhalogeniden. Die erhaltenen Celluloseallylether sind je nach Substitutionsgrad wasserlöslich (DS 0,3 - 0,7), in wasserhaltigen organischen Lösungsmitteln löslich (DS 0,7 - 1,0) oder organolöslich (DS > 1,0). Umfassende Untersuchungen über Allylcellulose wurden 1965 von Yoshimura unternommen^[90-92]. Neben Variation der Synthesebedingungen (Basenkonzentration, Temperatur) untersuchte er die Löslichkeitseigenschaften, wobei auch außergewöhnliche Substanzen wie verschiedene Vinylmonomere zum Einsatz kamen, in welchen sich die Allylcellulosen in der Regel gut lösten^[90]. Auch die Reaktionen zwischen Allylcellulose und Vinylmonomeren sowie Methylmethacrylat wurden untersucht und die physikalischen Eigenschaften der erhaltenen Produkte wie z.B. die Glasübergangstemperaturen bestimmt^[91]. Das Verhalten der Produkte im Alkalischen sowie Möglichkeiten ihrer Stabilisierung standen ebenfalls im Fokus von Yoshimuras Forschungsarbeiten^[92]. Eine andere Strategie zur Synthese von Allylcellulosen verfolgten Kondo *et al.* Sie überführten Cellulosederivate wie Celluloseacetat in die Allylether^[93]. Die Reaktion erfolgte in DMSO unter Zusatz von NaOH und Allylchlorid. Acetatgruppen wurden unter diesen Bedingungen abgespalten und vollständig durch Allyl ersetzt. Ausgehend von Methylcellulose (DS = 1,6) erhielten sie gemischte Methyl-allyl-ether der Cellulose. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte neben der Elementaranalyse durch moderne instrumentelle Analysetechniken (¹³C/¹H-NMR, IR, TG, DSC). Die erhaltenen Produkte (Methyl-allyl-, Allylcellulose sowie ergänzend Ethyl-allyl-cellulose) wurden in einer nachfolgenden Studie eingesetzt, um eine weitere Funktionalisierung der Allylgruppen zu

Aldehyden durch Ozonierung unter mild reduktiven Bedingungen vorzunehmen^[94]. Auf diese Weise sollte im Vergleich zu periodat-oxidierter Cellulose stabilere Aldehydocellulose erhalten werden, deren Aldehydgruppen im Folgenden zur Reaktion mit Aminen und so zur Kopplung von z.B. Proteinen durch reduktive Aminierung dienen. Ausgehend von Allylcellulose aus der Reaktion von Cellulose in DMAc/LiCl mit NaOH und AllBr, synthetisierten Lin *et al.* Glycidylcellulose durch Reaktion der Doppelbindung mit Peressigsäure zum Epoxid^[95]. Die Produkte wurden mittels ¹H-/ ¹³C-NMR- und FTIR-Spektroskopie sowie TGA und GPC charakterisiert und der jeweilige Substitutionsgrad durch Titration überprüft. Ein partieller Polymerabbau, resultierend in einer bimodalen Verteilung bei der GPC-Analyse, sowie die Bildung von Estern, wurden als Nebenreaktionen der Epoxidierung beobachtet. Sawatari *et al.* nutzen Allylcellulose als Edukt für die Einführung von Aminogruppen in das Celluloserückgrat^[96]. Hierbei erfolgte zunächst eine Bromaddition zu 2,3-Dibrompropyl-Cellulose, welche nachfolgend mit ca. 15 verschiedenen Aminen zur Reaktion gebracht wurde. Die erhaltenen Produkte eigneten sich zur Metallkomplexierung und Farbstoffadsorption und waren mittels Cellulase abbaubar. Eine intensive NMR-spektroskopische Charakterisierung der Allylcellulose wurde in jüngerer Zeit von Sachinvala *et al.* vorgenommen^[97]. Durch die Anwendung verschiedener zweidimensionaler NMR-spektroskopischer Messtechniken wie (DQF-)COSY, TOCSY, HSQC und HMBC konnten sämtliche Resonanzen der Allylcellulose eindeutig zugeordnet werden. Sie sollen zukünftig als Grundlage zur Aufklärung der Mechanismen verschiedener Reaktionen von Allylcellulose (Crosslinking, Epoxidierung, Komplexierung) dienen. Aktuelle Forschung bei der Synthese von Cellulosederivaten konzentriert sich auf den Einsatz von neuartigen Lösungsmitteln wie ionischen Flüssigkeiten. Gute Umsetzungen konnten in jüngster Zeit Heinze *et al.* bei der Allylierung von Cellulose in DMSO/Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) erzielen^[98]. Der Substitutionsgrad konnte in einem weiten Bereich zwischen 0,50 und 2,98 eingestellt werden.

Nud'ga *et al.* widmeten sich dem **Allylchitosan**. Die Synthese des Allylethers erfolgte in Isopropanol mit Allylbromid, wobei auch die Kinetik der Reaktion untersucht wurde^[99]. Bei größeren Allyl-Substitutionsgraden beobachteten sie neben der gewünschten Veretherung der Hydroxygruppen wie zu erwarten auch eine Substitution an den stärker nucleophilen Aminogruppen des Chitosans (*N*-Allylierung). Die Produkte wurden mit γ -Strahlen behandelt, was zur Oxidation führte und je nach DS_{Allyl} vorwiegend eine

Vernetzung (hoher DS) oder einen Abbau der Derivate (niedriger DS) nach sich zog^[100]. Neuere Arbeiten befassen sich mit der Kinetik der durch Ammoniumperoxodisulfat initiierten Graft-Polymerisation von Vinylacetat auf Allylchitosan^[101]. Der Allylgehalt beeinflusst dabei die Initiationsreaktionsrate, die Anzahl der „gegrafteten“ Polyvinylacetat-Ketten und die Struktur des resultierenden Graft-Polymers.

Bereits kommerzielle Bedeutung erlangte **Allyldextran**. In unterschiedlich stark vernetzter Form wird es als Sephacryl[®]-Gel schon lange zur Größenausschlusschromatographie und Gelfiltration genutzt (siehe Abb. 3-4). Hierbei wird Allyldextran mit *N,N'*-methylenbis(acrylamid) zur Reaktion gebracht und so eine kovalent verzweigte, hydrophile Matrix von hoher mechanischer Festigkeit und einstellbarer Maschenweite erhalten.

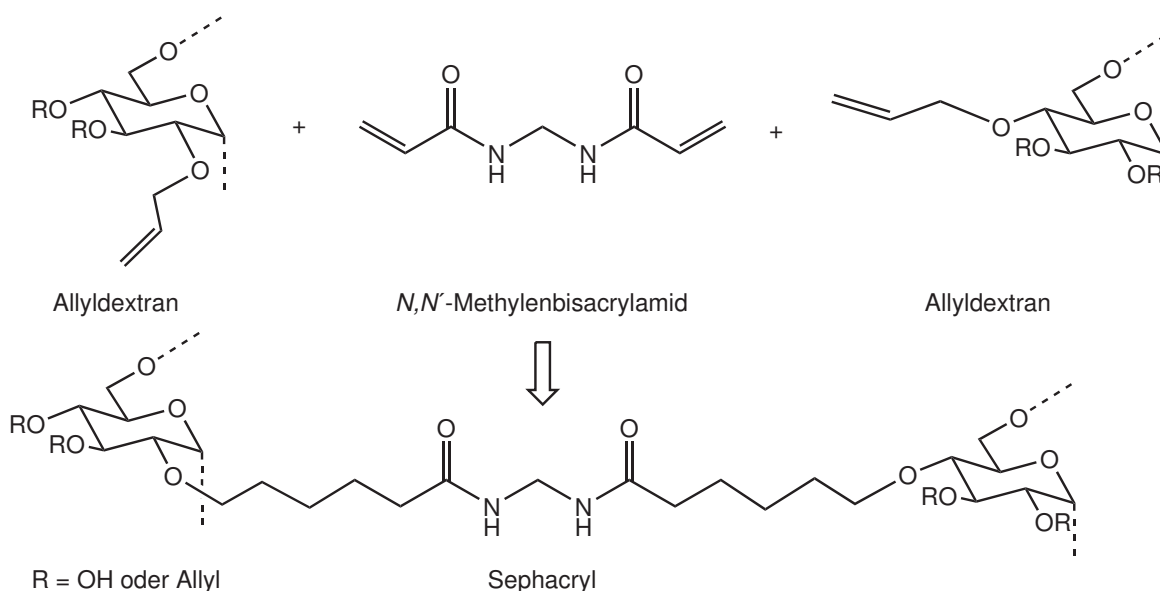


Abb. 3-4 Synthese von Sephacryl[®] durch Polymerisation von Allyldextran mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid.

Im Bereich der Forschung konnte gezeigt werden, dass Allyldextran als Träger für Bor von medizinischem Interesse ist^[102]. Durch eine kovalente Anbindung von Na₂B₁₂H₁₁SH (BSH) mittels radikalischer Additionsreaktion konnten 1200-1500 Boratome je Dextranmolekül fixiert werden. Diese Konjugate sind möglicherweise für die „boron neutron capture therapy (BNCT)“ nutzbar. Die Synthese des Allyldextrans erfolgte in wässriger Natronlauge unter Zusatz von Natriumborhydrid. Bei 40 °C wurde das deprotonierte Dextran mit ca. 1 Äq./OH Allylbromid für drei Stunden zur Reaktion gebracht. Die strukturelle Charakterisierung und die Bestimmung des Allylgehaltes

erfolgten jedoch allein durch Elementaranalyse und wurden nicht im Detail angegeben. Gao *et al.* setzten Allyldextran zur Oberflächenbeschichtung eines Polystyrol-Biochips ein^[103]. Hierbei erfolgte zunächst eine Aktivierung des Polystyrols durch γ -Strahlung. Anschließend wurde eine Allyldextran-Lösung aufgebracht und der Chip über Nacht inkubiert. Die nun kovalent gebundene Allyldextranschicht wurde mit Natriumperiodat oxidiert und Streptavidin oder Neutravidin durch reduktive Aminierung mittels NaCNBH_3 gebunden. Die erhaltene sehr hydrophile Beschichtung zeigte kaum unspezifische Adsorption, weshalb die selektive Anbindung Biotin-markierter Derivate und damit der Einsatz als Biosensor vielversprechend scheint.

Strukturell verwandte ungesättigte Kohlenhydratether und -ester

Neben Allyl gibt es einige strukturell verwandte ungesättigte Ether und Ester, die in der Kohlenhydratchemie eine gewisse Bedeutung erlangt haben (siehe Abb. 3-5).

Um eine Methylgruppe erweitert ist der β -**Methallylether (2-Methyl-2-propenylether)**. Yanovsky untersuchte diese Ether von verschiedenen Kohlenhydratderivaten wie Sorbit, Mannit oder Saccharose und verglich diese mit ihren korrespondierenden Allylderivaten^[69]. Dabei stellten sich die niedermolekularen β -Methallylether als etwas reaktionsträger heraus, was sich in verminderter Polymerisationstendenz und einer notwendigen Aktivierung durch Katalysatoren äußerte. Kondo *et al.* stellten parallel Allyl- und Methallylcellulose aus Methylcellulose oder Celluloseacetat, NaOH und den jeweiligen ungesättigten Chloriden dar^[93]. Sie fanden ein ähnliches Verhalten beim Erhitzen an der Luft (Oxidation) und unter Heliumatmosphäre (stabil).

Isogai *et al.* synthetisierten verschiedene ungesättigte Cellulosederivate in dem Lösungsmittel SO_2 /Diethylamin/DMSO, wobei sie ebenfalls NaOH als Base und die jeweiligen Chloride als Alkylierungsreagenzien einsetzten^[104]. Auf diese Weise erhielten sie u. a. neben Tri-*O*-allyl- auch Tri-*O*- β -methallyl- und Tri-*O*-2-**butenyl**-cellulose (**Crotylcellulose**).

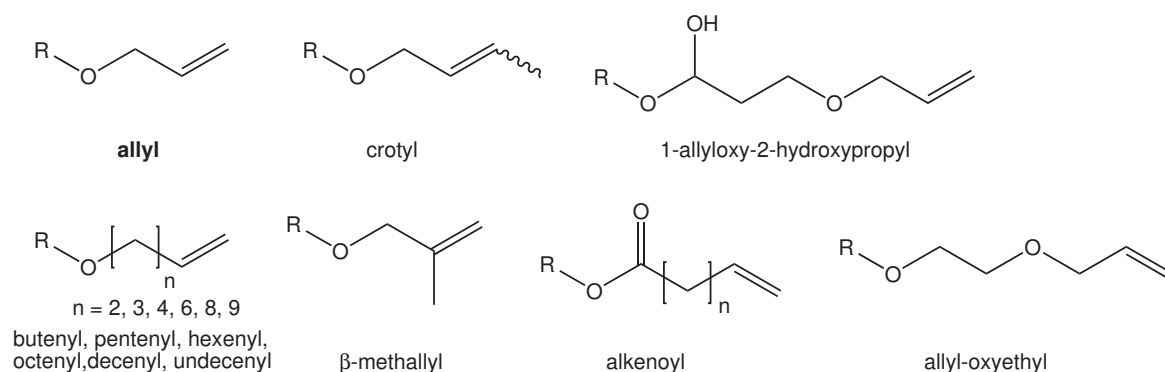


Abb. 3-5 Übersicht über mit dem Allylether strukturell verwandte ungesättigte Ether und Ester

Die Synthesen gelangen auch mit den längerkettigen Alkenylchloriden nahezu quantitativ ($DS = 3$), allerdings waren diese ungesättigten Ether ebenfalls oxidationsempfindlich. Eine Charakterisierung der Produkte erfolgte mittels IR- sowie 1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Moderne mehrdimensionale NMR-Untersuchungen von Crotylcellulose finden sich bei Sachinvala^[97]. Im Vergleich zu Allylcellulose wies Crotylcellulose wegen ausgebliebener Vernetzung eine geringere Polydispersität auf. DSC-Messungen zeigten, dass Crotylcellulose ein semikristallines Polymer ist, das einen Schmelzpunkt, Rekristallisation und eine Hystereseschleife aufweist. Im Gegensatz dazu zeigt Allylcellulose kein derartiges Verhalten, sondern vernetzte bei Temperaturen über 100 °C zu einer unlöslichen Substanz.

Weitere längerkettige Alkenylether wurden von Hanessian *et al.* für α -, β -, und γ -Cyclodextrine erprobt^[48]. Hierbei erfolgte mit den Alkenylbromiden und LiI / LiH in DMSO selektiv eine Monoalkylierung allein der 2-Hydroxygruppen. Die nach säulenchromatographischer Reinigung erhaltenen Mono-2-*O*-allyl-, *O*-**hexenyl**- und *O*-**octenyl**-Ether der Cyclodextrine wurden schließlich weiter zu Carboxyl- oder Aminoethern funktionalisiert. Die Länge des Alkylspacers schien in dieser Studie keinen nennenswerten Einfluss auf den Verlauf der Synthesen zu haben.

Besondere Bedeutung, speziell im Bereich der Glykoside, haben **Pentenyl**derivate erlangt. Deren Implementierung erfolgte 1988 durch Fraser-Reid, welcher die Kompatibilität von Pentenylethern mit anderen Schutzgruppen wie Allyl oder Benzyliden zeigen konnte^[105]. Eine chemospezifische Freisetzung des als Pentenylglykosid geschützten und für Glykosidsynthesen aktivierten anomeren Zentrums war auf diese Weise möglich. Pentenyl

dient auf vielfältige Weise auch als Intermediat für weitere Funktionalisierungen (siehe Kapitel 3.3)^[106,107]. Bei der aktuell viel beachteten Synthese von Nanopartikeln konnte Pent-4-enyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-mannopyranosid als Intermediat erfolgreich zur Beschichtung von Goldnanopartikeln mit Mannose eingesetzt werden^[108]. Verschiedene Spacerlängen untersuchten auch Damez *et al.*, die Hexenyl-, Decenyl- und Undecenyl-Glykoside von D-Xylose synthetisierten^[109]. Zudem stellten sie auch 1-*O*-Alkenoylglykoside (C₁₁) der D-Xylose dar. Die erhaltenen Derivate zeigten oberflächenaktive Eigenschaften und könnten als nichtionische Tenside für Kosmetika interessant sein.

Ein verwandter „Oxy-allyl“ Ether“ ist die von Nud’ga *et al.* beschriebene **Allyloxyethyl-cellulose**^[110]. Auf diese wurde Vinylacetat in einer Graftpolymerization gepfropft. Auch die von Tsai *et al.*^[111] sowie in jüngerer Zeit von Huijbrechts *et al.*^[112-114] beschriebenen **1-Allyloxy-2-hydroxypropyl Stärken (Allylglycidylether)** zählen zu dieser Gruppe^[114]. Im Vergleich zu den Ausgangsstärken sank bei 1-Allyloxy-2-hydroxypropyl Stärke die Kristallinität und war die Gelierungstemperatur erniedrigt. Die Quellfähigkeit und der Löslichkeitsindex nahmen mit steigendem DS zu (max. DS = 0,10), wohingegen das granuläre Erscheinungsbild der Stärken nahezu unverändert blieb^[113].

3.2 Reaktionen der Allylgruppe

3.2.1 Allylether als Schutzgruppen

Zum Schutz von Hydroxygruppen ist deren Maskierung als Ether eine bewährte Strategie^[115]. In der Kohlenhydratchemie hat sich besonders der Allylether bewährt, da dieser kompatibel mit den meisten Glykosylierungsreaktionen ist^[116]. Die Allylgruppen sind allerdings nicht inert gegenüber starken Elektrophilen wie Brom oder bei katalytischen Hydrierungen, jedoch stabil in saurem Milieu (z.B. 1 M HCl, 10 h Rückfluss)^[115]. Ein umfassender Review über den Einsatz, Synthese und Spaltung des Allylethers als Schutzgruppe für Alkohole ist von Guibé^[117] erschienen. Nach erfolgter Funktionalisierung eingeführter Allylether könnten auf diese Weise nicht umgesetzte Allylgruppen gespalten und so aus dem Polysaccharid wieder entfernt werden, weshalb diese Möglichkeit auch für das Konzept der vorliegenden Arbeit interessant ist.

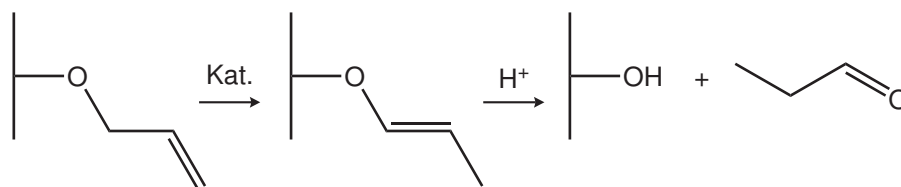


Abb. 3-6 Abspaltung der Allylschutzgruppe nach Isomerisierung zum Prop-1-enyl-ether und nachfolgende Hydrolyse des Enolethers

Eine gängige Methode zur Spaltung des Allylethers ist dessen Isomerisierung zum Prop-1-enyl-Ether z.B. basenkatalysiert durch Kalium-*tert*-butoxid in DMSO oder durch Übergangsmetall-Katalysatoren wie das wasserstoffaktivierte 1,5-Cyclooctadien-bis(diphenylmethylphosphin)-iridium-(I)-hexafluorophosphat $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{Ph}_2\text{MeP})_2]\text{PF}_6$ in THF^[3,79,115] oder $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ ^[118]. Die Anwendung von Kalium-*tert*-butoxid zur Isomerisierung erwies sich jedoch für die Anwendung bei per-*O*-allylierten Oligo- und Polysacchariden aufgrund von auftretender Depolymerisation als nicht geeignet^[3]. Die nachfolgende Spaltung des Enolethers zum Alkohol (siehe Abb. 3-6) kann z.B. durch eine milde Hydrolyse (0,1 M HCl), durch Epoxidierung (*m*-CPBA/MeOH/H₂O) oder Ozonolyse erfolgen^[115]. Auflistungen weiterer Spaltungsmöglichkeiten wie durch Lewis Säuren (AlCl_3), Ti(0), Hg-Salze^[119], SmCl_3 oder SeO_2 finden sich bei Greene^[115] und Guibé^[117].

Ein für diese Arbeit interessanter Aspekt ist die Chemo-De-Novo-Synthese von Dextranen durch Kationische Ringöffnungspolymerisation (CROP) von 1,6-Anhydro-2,3,4-tri-*O*-allyl- β -D-glucopyranose^[16]. Initiiert durch Bortrifluorid ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) erfolgt die Polymerisation der Allylether binnen sechs Tagen mit einer Ausbeute von 84 % (Abb. 3-7, 1). Das Molekulargewicht betrug 21700 g/mol (DP ca. 134) bei einer relativ geringen Polydispersität von 2,10. Nach saurer Hydrolyse der Propenylether (Isomerisierung mittels $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}/1,4\text{-Diazabicyclo}[2.2.2]\text{octan}$) konnte bei unverändertem Polymerisationsgrad Poly-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopyran (Dextran) erhalten werden (Abb. 3-7, 2).

Obgleich der Allylether als temporäre Schutzgruppe in der organischen Synthese gut etabliert ist, besteht eine ausreichende Stabilität, um als Intermediat für weitere Funktionalisierungen zu dienen.

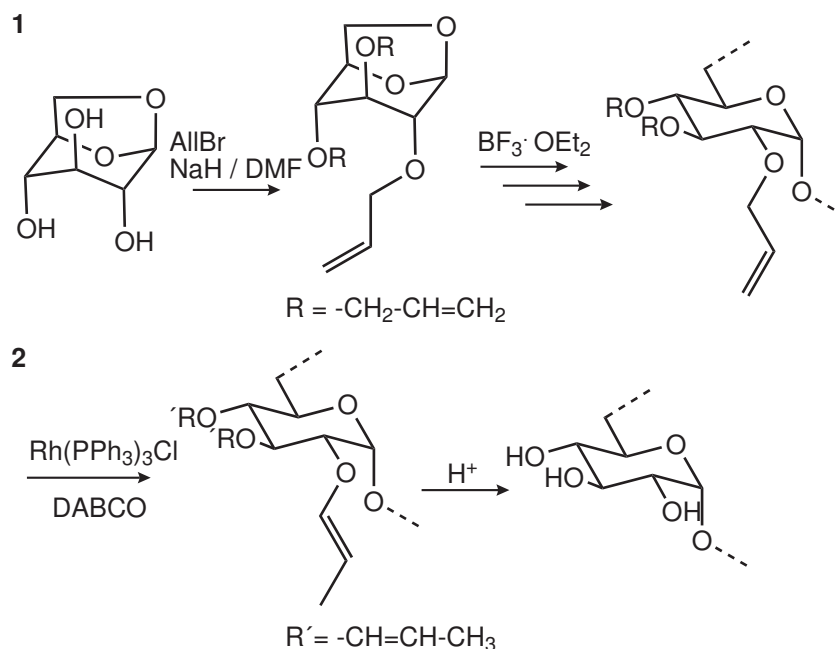


Abb. 3-7 Chemische Synthese von Dextran durch CROP (1) und anschließende Spaltung der Allylether (2).

3.2.2 Nebenreaktionen und Crosslinking von Allylgruppen

Allylhalogenide neigen neben der gewünschten Williamsonschen Veretherung der Kohlenhydrathydroxylgruppen zu Nebenreaktionen. Das Allylhalogenid (All-X) wird dabei zum Allylalkohol hydrolysiert und reagiert im zweiten Schritt mit einem weiteren All-X zum Diallylether (siehe Abb. 3-8, A)^[84]. Diese Substanzen finden sich häufig als Verunreinigungen in den Kohlenhydrat-Allylethern und müssen durch Destillation (Hochvakuum) oder Extraktion (Soxhlet) abgetrennt werden.

Allylether sind empfindlich gegenüber Licht, Sauerstoff und Temperatureinwirkung. Am zur Doppelbindung α -ständigen C-Atom kann es zur homolytischen Spaltung einer C-H Bindung (Dissoziationsenergie C-H hier 322 kJ/mol^[120]) und damit Radikalbildung kommen - ein Mechanismus, der von der Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren in der Lebensmittelchemie gut bekannt ist^[120]. Aufgrund des benachbarten Sauerstoffatoms ist bei Allylethern die Dissoziationsenergie geringer und das entstehende Radikal stabilisiert, so dass die homolytische Spaltung noch propargiert wird.

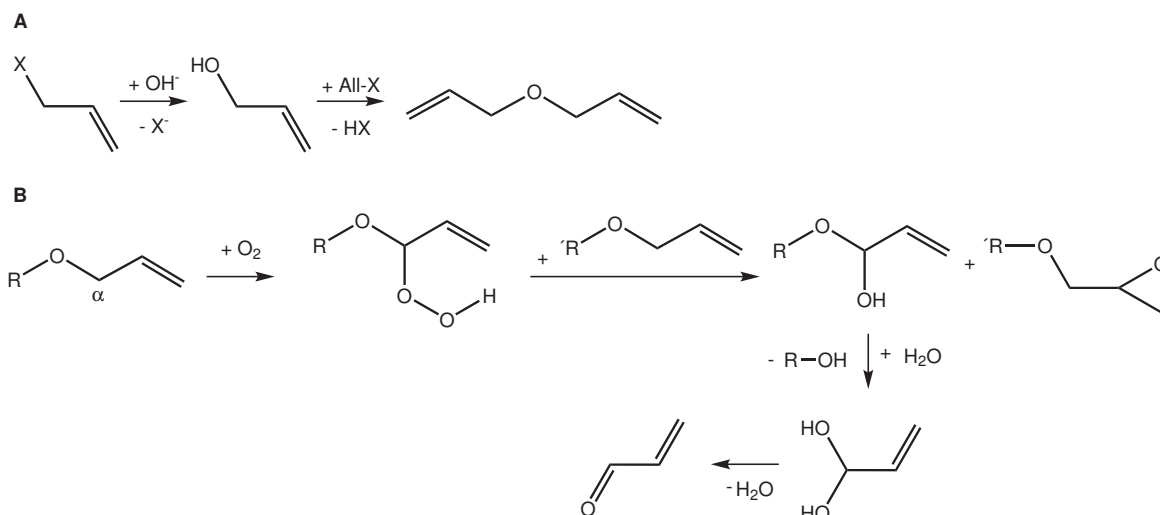


Abb. 3-8 Nebenreaktionen der Allylether. **A:** baseninduzierte Hydrolyse des Allylhalogenids zum Allylalkohol und Weiterreaktion zum Diallylether. **B:** Bildung von Hydroperoxiden und Acrolein.

Die α -Stellung (Abb. 3-8, B) ist dabei aufgrund der Mesomeriestabilisierung besonders gefährdet. Die entstandenen Radikale und Hydroperoxide^[85] initiieren eine Kettenreaktion, wodurch es sowohl zu intra- als auch zu intermolekularen Polymerisationen (Crosslinking) der Allylderivate kommen kann (siehe Abb. 3-9)^[97]. Bei einer intermolekularen Reaktion und damit Vernetzung der Produkte, nimmt das mittlere Molekulargewicht zu. Diese Beobachtung wurde bei Allylcellulose bestätigt, welche nach einem Jahr Lagerung selbst unter Lichtausschluss eine deutliche Erhöhung des Polymerisationsgrades von etwa 400-500 auf ca. 13000 (GPC) aufwies^[98]. Die thermische Stabilität von Allylcellulose ist zudem abhängig von der Umgebungsatmosphäre. Bei Gegenwart von Luft - und damit potentiell Sauerstoffradikalen - zeigte Allylcellulose bei TG- und DSC-Analysen exotherme Peaks und eine Gewichtszunahme^[93]. Beim Erhitzen unter Heliumschutzgas blieben die ungesättigten Cellulosen hingegen bis 200 °C beständig. Tiefe Temperaturen um den Gefrierpunkt trugen ebenfalls zur Stabilität der Produkte bei, wohingegen Lagerung bei 20 und 80 °C zum Crosslinking und damit zur Unlöslichkeit der Produkte führte. Der durchdringende, stechende Geruch, der Allylprodukte häufig begleitet, wird vermutlich durch die Bildung von Acrolein (Propenal) hervorgerufen, welches aus der Zersetzung von Hydroperoxiden bei Anwesenheit von katalytischen Wassermengen gebildet werden kann (siehe Abb. 3-8, B)^[67].

Die Lagerung von Allylderivaten muss daher sehr umsichtig geschehen^[92]. Als erfolgreiche Unterdrückung der Oxidation und des Crosslinkings (Abb. 3-9) hat sich ein BHT- oder Hydrochinonzusatz als Radikalfänger bewährt^[69,97,98]. Zusätzlich sollte die Lagerung unter Lichtausschluss, Schutzgasatmosphäre (N₂, Ar, He) und bei tiefen Temperaturen (0 °C) erfolgen.

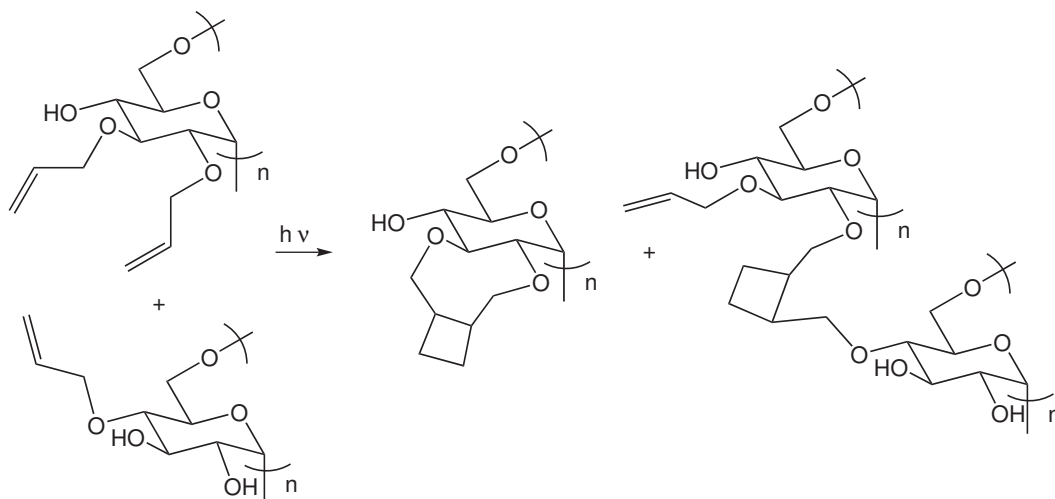


Abb. 3-9 Prinzip der intra- und intermolekularen photoinduzierten Vernetzung (Crosslinking) von Allyldextran, nach ^[97].

Bei der Analytik von Allylkohlenhydraten muss außerdem eine mögliche intramolekulare Spiroetherbildung als Nebenreaktion im sauren Milieu in Betracht gezogen werden. Bei Glucose ist besonders ein Allylether in Position 2 gefährdet, da dieser einen energetisch günstigen Sechsring mit dem intermediär bei der Hydrolyse gebildeten Oxoniumion ausbilden kann (siehe Kapitel 6.1.2.4).

3.3 Alkenylgruppen als reaktive Intermediate

Eine Fülle an etablierten Reaktionen der Alken-/Olefin-Chemie steht für weitere Umsetzungen der Alkenylether zur Verfügung. Jedoch muss für Kohlenhydrate die Kompatibilität mit den vorhandenen Funktionalitäten der Zucker (Hydroxylgruppen, Halbacetale, glykosidische Bindungen) gegeben sein. Im Folgenden werden einige Forschungsarbeiten zur Funktionalisierung von Kohlenhydrat-Alkenylethern und Alkenylglykosiden vorgestellt (siehe Abb. 3-10).

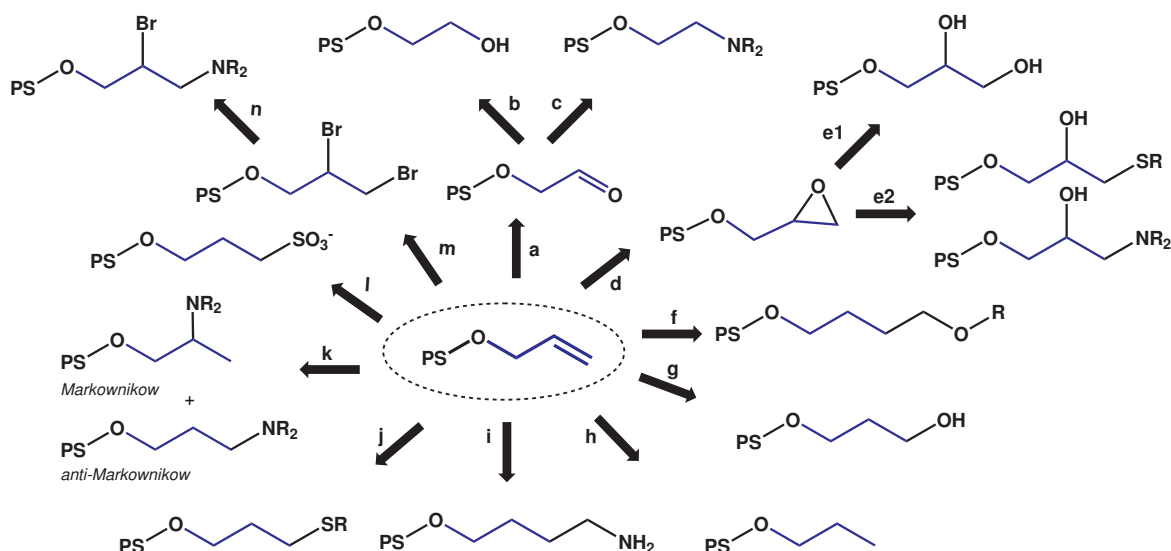


Abb. 3-10 Übersicht über mögliche Funktionalisierungen von *O*-Alkenylethern. PS = Polysaccharid.
a: Ozonolyse (+ O₃), **b:** Reduktion (NaBH₄), **c:** Reduktive Aminierung (NaCNBH₃/NHR₂), **d:** Epoxidierung (Persäuren, Dioxirane, oder H₂O₂), **e₁:** Ringöffnung zum Diol (HClO₄ oder OH⁻), **e₂:** nucleophile Ringöffnung (NHR₂, R-SH), **f:** Metathese (H₂C=CH-CH₂-OR, [Cl₂(PCy₃)₂Ru=CHPh], PhH, Pd/C), **g:** Hydroborierung (BR₃/OH/H₂O₂), **h:** Reduktion (H₂, Pd/C), **i:** Hydroaminomethylierung (CO/H₂/Kat, NH₃), **j:** Radikalische Addition (SH-R, UV oder AIBN), **k:** Hydroaminierung (HNR₂, Kat. Pd,Rh,Ir), **l:** Sulfonierung (Addition, HSO₃⁻), **m:** Elektrophile Addition (Br₂), **n:** nucleophile Substitution (*N*-Nucleophil).

Die für diese Arbeit relevante **Epoxidierung** (siehe Kapitel 4.3), ***N*-** und ***S*-nucleophile Ringöffnung** (siehe Kapitel 4.5) und **Hydroaminomethylierung** (siehe Kapitel 4.7) sind den Ergebnissen der eigenen Arbeiten vorangestellt.

3.3.1 Elektrophile Addition

Eine Eigenschaft der Allylether und der Olefine im Allgemeinen ist ihr Bestreben, die vergleichsweise instabile π -C-C Bindung in zwei stabilere σ -Bindungen mit zwei Substituenten a und b umzuwandeln^[121]. Obgleich durch die elektronenziehenden Eigenschaften des Sauerstoffs im Allylether dessen Elektrophilie herabgesetzt ist, können trotzdem noch Additionen von z.B. Halogenen an die Doppelbindung erfolgen. In einer einfachen elektrophilen Additionsreaktion (A_E) von Br_2 an die Allyl-Doppelbindung erfolgt die Reaktion zum 2,3-Dibrompropylether (Abb. 3-10, m). Dieser Reaktion bediente man sich früher häufig, um den Substitutionsgrad an Allyl über eine einfache Titration zu bestimmen (sog. Halogen(Iod)zahl-Bestimmung). In einer nachfolgenden nucleophilen Substitution kann ein Bromatom durch ein *N*-nucleophiles Amin ersetzt werden, so dass 3-Amino-2-brom-propylether entstehen (siehe Abb. 3-10, n und Abb. 3-11). Sawatari *et al.*

nutzen diese Sequenz, um aus Allylcellulose ($DS_{\text{allyl}} \sim 0.37$) über die Zwischenstufe des 2,3-Dibrompropylethers zu 3-Amino-2-brom-propylethern der Cellulose zu gelangen^[96]. Hierbei setzten sie verschiedene Amine (darunter mehrere Diamine und Ammoniak) ein. Die erhaltenen Cellulosen zeigten interessante Eigenschaften hinsichtlich Schwermetallbindung (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}), Ionenaustausch, Farbstoffadsorption und Resistenz gegenüber Cellulase. Leider wurden die erhaltenen Produkte analytisch wenig charakterisiert, so dass eine Aussage über Effizienz, Umsatz oder Nebenprodukte, wie z.B. Aziridin- / Aziridiniumbildung und Substitution des sekundären Broms, kaum möglich ist.

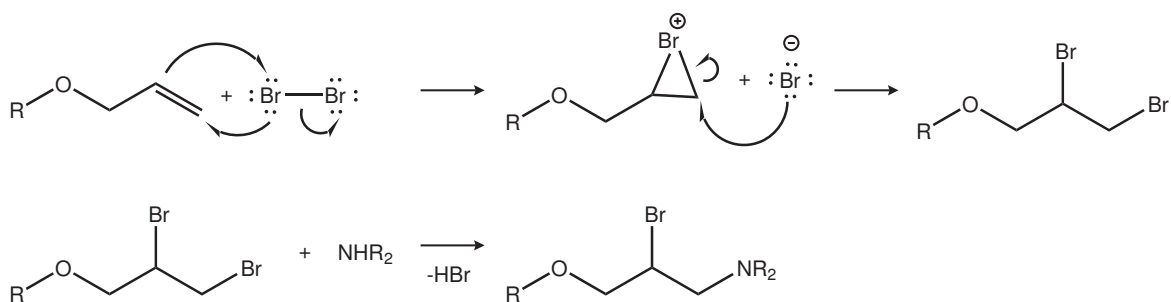


Abb. 3-11 Mechanismus der elektrophilen Addition von Brom an Doppelbindungen über cyclische Bromoniumionen sowie *N*-nucleophile Substitution des Brom durch Amine.

3.3.2 Ozonolyse / Oxidation zum Aldehyd

Bei der Einwirkung von Ozon auf C=C-Doppelbindungen kommt es zunächst zu einer 1,3-dipolaren Cycloaddition und Bildung des Primärozonids^[122,123] (siehe Abb. 3-10, a-c und Abb. 3-12). Diese instabilen Intermediate zerfallen zu einem Carbonyloxid und einer weiteren Carbonylverbindung. In einer Cycloreversion-Cycloadditions-Folge entsteht hieraus das Ozonid. Dessen Hydrolyse führt je nach Reaktionsbedingungen zu verschiedenen Produkten: unter oxidativen Bedingungen (H_2O_2 oder NaClO_2) reagieren die entstandenen Aldehyde zur Carbonsäure, unter den üblicheren reduktiven Bedingungen erhält man die Ketone und Aldehyde ($(\text{CH}_3)_2\text{S}$ oder Ph_3P) bzw. Alkohole (NaBH_4 oder LiAlH_4)^[121].

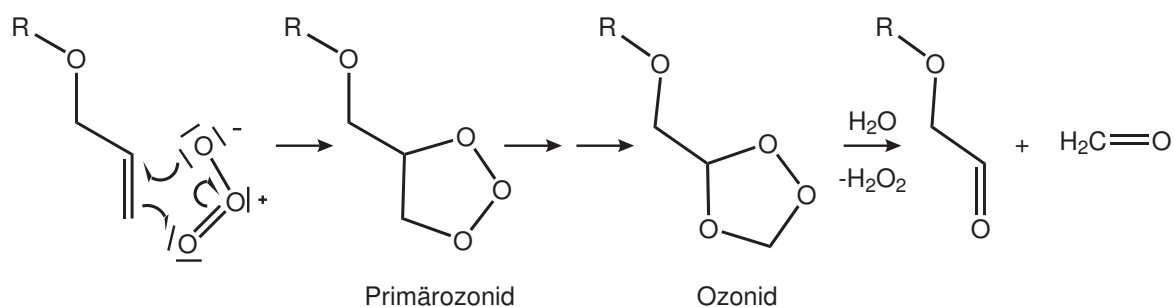


Abb. 3-12 Ozonolyse von Allylethern: Bildung des Primärozonids, des Ozonids und Hydrolyse des Ozonids.

In der Kohlenhydratchemie wurde die Ozonolyse von Alkenylethern erfolgreich eingesetzt. Beispiele hierfür ist die Oxidation des Allylethers und -glykosids zum Aldehyd, welche Dubber *et al.* zum Aufbau von Glykoclustern nutzten^[71,72]. Der Aldehyd wurde im Anschluss mit NaBH_4 zum Alkohol reduziert bzw. mit (Di)benzylamin und NaCNBH_3 zur Aminoalkylgruppe reaktiv aminierte. Dieselbe Strategie nutzte Bernstein zur Anbindung von Proteinen^[124] an die Allylglykoside. Hanessian synthetisierte primäre Aminoalkylether von Cyclodextrinen, indem er die Aldehyde aus den Allylethern reaktiv mit Benzylamin aminierte und im Folgenden mittels H_2 Pd/C hydrierte. Anionische Derivate erhielt er nach Oxidation der entstandenen Aldehyde mit Natriumchlorit (NaClO_2) zu den Polycarboxylaten^[48]. Buskas *et al.* oxidierten Pentenylglykoside zum Aldehyd, um im Anschluss eine Wittig-Reaktion mit dem Ylid des Triethylphosphonacetats durchzuführen oder die Reduktion zum Alkohol mit einem Boran-Dimethylsulfid-Komplex anzuschließen^[107]. Kondo zeigte mit der Synthese von Aldehydocellulose ($\text{O}_3 / (\text{CH}_3)_2\text{S}$) die prinzipielle Verträglichkeit der Ozonolyse mit Polysacchariden^[94]. Es fand keine Depolymerisation der Cellulose statt, allerdings wurde ein Teil der eingeführten Allylgruppen bei dieser Art der Funktionalisierung wieder abgespalten.

3.3.3 Radikalische Addition von Thiolen

Bei der *anti*-Markownikow Addition von Thiolen an ungesättigte Verbindungen (Abb. 3-10, j) handelt es sich um eine radikalische Kettenreaktion^[125]. Initiiert durch Radikalstarter wie Azobisisobutyronitril (AIBN), Peroxide (z.B. Dibenzoylperoxid) oder UV-Licht entstehen Alkylthiyl-Radikale, welche an das ungesättigte Substrat binden und C-Radikale ausbilden (siehe Abb. 3-13). Hierbei bildet sich vor allem das *anti*-Markownikow Addukt, da dieses Allyl-C-Radikal durch die positiven induktiven Effekte der Methylengruppen besser stabilisiert ist.

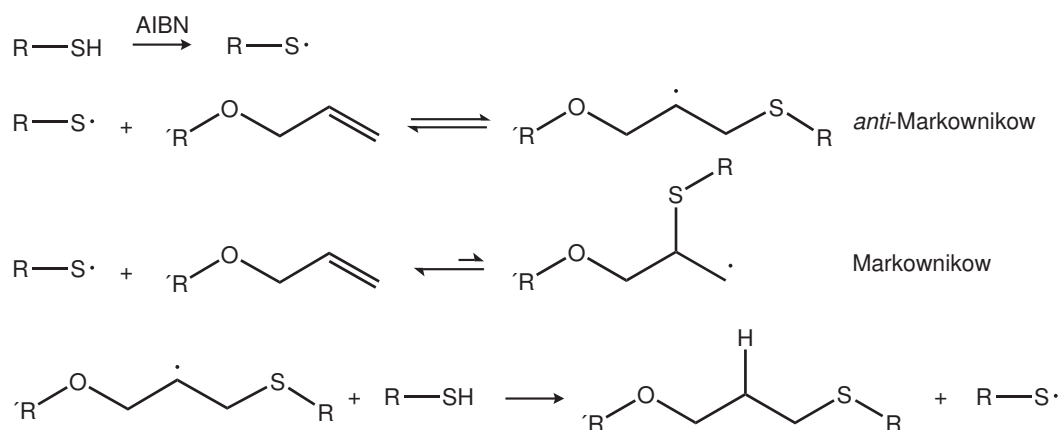


Abb. 3-13 Mechanismus der Thiol-Addition an ungesättigte Ether

Das C-Radikal reagiert mit einem weiteren Thiol-Molekül und setzt die Reaktion durch Generierung eines neuen S-Radikals fort. Wie bei vielen radikalischen Reaktionen kommt es zur Kettenabbruchreaktion z.B. durch Kombination zweier Radikale.

In der Kohlenhydratchemie kommt die radikalische Addition von Schwefelnucleophilen an Alkenylether häufig zum Einsatz, wie z.B. zum Aufbau komplexer Glykokluster. Van Seeventer *et al.* synthetisierten Allylglykoside von Glucose, Fucose und Cellobiose, und brachten diese unter Einsatz des Radikalstarters AIBN zur Reaktion mit Pentanthiol, Methyl-3-mercaptopropionat oder 2-Mercaptoethanol^[126]. Die Produkte setzten sie als Spacer für die Synthese von Glykokonjugaten ein. Heidecke *et al.* addierten 2-Mercaptoethanol an Methyl-2-O-benzyl-3,6-di-O-allyl- α -D-mannopyranosid^[127]. Diese Hydroxythioether addierten sie unter Zusatz einer Lewis-Säure (Trimethylsilyltriflat, TMSOTf) wiederum an Kohlenhydrat-O-allylether und bauten so komplexe Kohlenhydratgerüste auf. Fulton *et al.* verwendeten Allylcyclodextrine und addierten hieran verschiedene Thioglykoside unter UV Bestrahlung (Photoaddition), um Kohlenhydratcluster zu erhalten^[78]. Weitere Beispiele für radikalische Additionen von Thiolen an Allylcyclodextrine finden sich bei Leydet^[76], Hanessian^[48] und Ni^[73]. Polymere basierend auf Saccharose bauten Acosta Ortiz *et al.* durch die Reaktion von Diallylsaccharose mit Thiolen durch eine Thiol-en-Photopolymerisation auf^[128]. Sie erhielten einheitliche, vernetzte Polymere, die bis 230 °C stabil waren. Funktionalisierungen von Pentenylglucosiden nahmen Buskas *et al.* mit Butanthiol, Thioessigsäure und 2-Mercaptoethanol und AIBN vor^[107]. Auch diese Produkte dienten zum Aufbau von *neo*-

Glykokonjugaten. Lin *et al.* nutzten die durch radikalische Addition von Thioessigsäure an Pentenylglykoside erhaltene Thiomannose zur Herstellung von Gold-Nanopartikeln, wobei die Anbindung der Kohlenhydrate über kovalente Au-S-Bindungen erfolgte^[108]. Die gleichzeitige Einführung einer Aminogruppe durch radikalische Thioladdition ist bei Verwendung von Cysteamin möglich. Roy *et al.* bewiesen, dass bei der Addition von Cysteamin an Allylglykoside unter UV- oder AIBN-Katalyse selektiv nur das *anti*-Markownikow Produkt entsteht, da keine Methylgruppe im ¹H-NMR nachweisbar war^[129]. Die eingeführte Aminogruppe kann ihrerseits für weitere Funktionalisierungen oder Kopplungen zur Verfügung stehen, weshalb diese Art der Alkenyl-Funktionalisierung verschiedener Kohlenhydratether und -glykoside relativ populär ist^[71-73,130,131]. Neben Cysteamin oder dessen Hydrochlorid kommt auch das mit einer BOC-Schutzgruppe versehene Cysteamin als Reagenz mit zum Teil besserem Erfolg zum Einsatz^[107].

In der vorliegenden Arbeit wurde Cysteamin unter AIBN- oder (NH₄)₂S₂O₈-Katalyse an Allyldextrane addiert (siehe Kapitel 6.8).

3.3.4 Hydroborierung

Die von Brown^[132] entdeckte Addition von Boran (BH₃) an C=C-Doppelbindungen (Abb. 3-10, g) geschieht ohne katalytische Aktivierung und erlaubt eine regioselektive und *syn*-stereospezifische Funktionalisierung von Alkenen^[122]. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid in alkalischer Lösung erfolgt die Oxidation der gebildeten Organoborane zum Alkohol. Bei Zugabe von Chloramin oder Hydroxylamin-*O*-sulfonsäure (NH₂OSO₃H, HSA) folgt eine Umsetzung der Organoboran-Intermediate zu den entsprechenden primären Aminen^[133].

Heidecke *et al.* führten eine Hydroborierung mit 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (9-BBN) in THF an Methyl-3,6-di-*O*-allyl- α -D-mannopyranosid durch, um anschließend mit H₂O₂ und NaOAc zum Methyl-3,6-di-*O*-(1-hydroxypropyl)- α -D-mannopyranosid zu gelangen^[127]. Das erhaltene Diol wurde genutzt, um Glycodendrimere aufzubauen, wobei die Hydroxypropylether als Glykosylakzeptoren dienten. Nachteil dieser Reaktionssequenz war die Bildung diverser Nebenprodukte. Liaigre *et al.* setzten das aus der Hydroborierung (9-BBN / H₂O₂) eines Galactoseallylglycosids erhaltene 3-Hydroxypropylglykosid in einer nachfolgenden Sequenz über 3-Tosyloxypropyl- und 3-Azidopropyl- zum 3-Aminopropyl-

glycosid um^[134]. Der erhaltene Aminospacer wurde zur Anbindung der Derivate an eine Gelmatrix zur Immunoaffinitätschromatographie genutzt.

3.3.5 Reduktion

Die Reduktion der Allyldoppelbindung (Abb. 3-10, h) zum Propylether ist relativ einfach durchzuführen. Die Reaktion erfolgt z.B. in einer katalytischen Hydrierung (H_2) unter Verwendung von Pd-C oder Tris(triphenylphosphin)rhodium(I)chlorid (Wilkinson-Katalysator)^[107]. Jedoch ist dieses ein Umweg zur Einführung der Alkylgruppe, was in einer Einschrittreaktion einfacher mit Propylhalogeniden und Base geschehen kann. Analytisch ist diese Reaktion von Bedeutung, da auf diese Weise die Reaktivität der Allylgruppen ausgeschaltet wird (siehe Kapitel 6.1.2.4).

3.3.6 Hydroaminierung

Um eine Aminierung von Olefinen (Abb. 3-10, k) durchzuführen, bedarf es entweder der Aktivierung der N-H-Bindung des Amins oder der Aktivierung des Olefins durch leistungsstarke Katalysatoren^[135]. Das Stickstoffatom des Amins wird dabei vorzugsweise an das Kohlenstoffatom addiert, welches die wenigsten H-Atome trägt und liefert so das Markownikow-Produkt^[136] (siehe Abb. 3-14). Um das unverzweigte *anti*-Markownikow Addukt zu erhalten, bedarf es geeigneter Katalysatoren, z.B. Komplexe der späten (Rh, Pd, Pt) oder der frühen (Ti, Zr) Übergangsmetalle, um die Selektivität zu verschieben^[137-139].

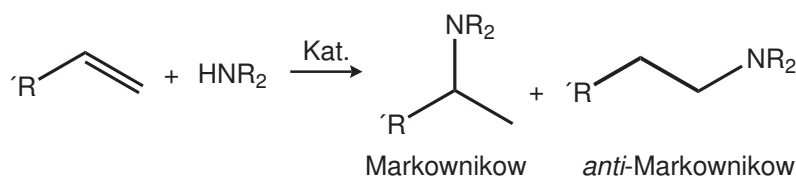


Abb. 3-14 Markownikow und Anti-Markownikow-Produkte der Hydroaminierung von ungesättigten Verbindungen.

3.3.7 Sulfonierung

Über die Addition von Hydrogensulfit (HSO_3^-) an die Allylgruppe (Abb. 3-10, l) gelangt man zu den Propylsulfonsäureethern. Wenz *et al.* nutzten diese Reaktion, um aus Allylcyclodextrinen verschiedener Ringgröße (α - and β -CD) durch Sulfonierung wasserlösliche Derivate zu erhalten, welche hydrophobe Gastmoleküle wie Arzneistoffe einschließen und so in Lösung bringen können^[74]. Das Hydrogensulfit wurde hierbei *in*

situ durch die Reaktion von Natriumpyrosulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) in wässriger saurer Lösung unter Katalyse von KNO_3 und Hitzeeinwirkung im Autoklav gebildet.

3.3.8 Weitere Möglichkeiten der Allyl-Funktionalisierung

Mit katalytischen Mengen eines Osmium(VIII)-Reagenzes (z.B. OsO_4) und Gegenwart von Wasser lassen sich Allylether bishydroxylieren (\rightarrow Diol). In einer Cycloaddition wird die Doppelbindung durch OsO_4 angegriffen und die entstandene cyclische Zwischenstufe durch Wasser hydrolytisch zum Diol gespalten. Kraus *et al.* oxidierten *O*-Allylether von β -Cyclodextrinen mit Osmiumtetroxid zu den 2,3-(Dihydroxy)propylethern^[75].

Vicinale Diole (Glykole) lassen sich mit Natriumperiodat NaIO_4 zu zwei Carbonylverbindungen^[121], im Falle des 2,3-(Dihydroxy)propylethers Formaldehyd und 2-Ethanal, spalten. Den nach Periodatspaltung erhaltenen Aldehyd reduzierten Kraus *et al.* mit NaBH_4 zum 2-Hydroxyethylether der β -Cyclodextrine. Durch diese Funktionalisierung wird der äußere Teil der Cyclodextrine polarer und so der Transport von lipophilen Molekülen in den CD-Kavitäten auch in polaren Medien möglich. Auch Karskela *et al.* wandten die Strategie der Oxidation mit OsO_4 und nachfolgender Periodatspaltung des Diols (mit NaIO_4) an, um von geschützten Allylglykosiden zu den Aldehyden zu gelangen^[140]. Sie stellten Hyaluron-Disaccharide her, deren Rolle als Mediatoren bei zellulären Endocytosestudien untersucht werden sollte. Buskas *et al.* oxidierten geschützte Pentenylglucoside mit $\text{OsO}_4/\text{NaIO}_4$ zu den Aldehyden oder mit $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$ weiter bis zu den Carbonsäuren und erhielten jeweils Ausbeuten um 70 %^[107].

Eine eher ausgefallene Behandlung und Funktionalisierung vollzogen Nud'ga *et al.* mit der γ -Bestrahlung von *O*-Allylchitosan^[100]. Die hochenergetischen elektromagnetischen Wellen führten zur Oxidation der Allylether bis zur Carboxylgruppe. Außerdem traten Crosslinking sowie ein Abbau des Polysaccharids auf.

Pearce *et al.* verwendeten regioselektiv an Cyclodextrine eingeführte Allylgruppen für eine Überbrückung des Rings durch Metathese-Kupplung (Abb. 3-10, f)^[141].

Nach der ausführlichen Schilderung des großen Potentials der Alkenylether für weitere Funktionalisierungen, werden in den folgenden Kapiteln eigene Ergebnisse zur Funktionalisierung von Alkenylethern präsentiert.

4 Reaktionen an Glucose-Modellsubstanzen

Bei der Modifizierung von Polysacchariden durch polymeranaloge Umsetzungen erhält man komplexe Produktgemische. Die detaillierte chemische Analytik dieser Gemische stellt eine besondere Herausforderung dar und ist aufwändig. Daher wurde die prinzipielle Durchführbarkeit ausgewählter Alkenylfunktionalisierungen am geschützten Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) bzw. dem homologen Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**) überprüft. Aufbauend auf den so gewonnenen Erkenntnissen wurden die erfolgversprechenden Reaktionen anschließend auf Alkenyldextrane übertragen (siehe Abb. 4-1).

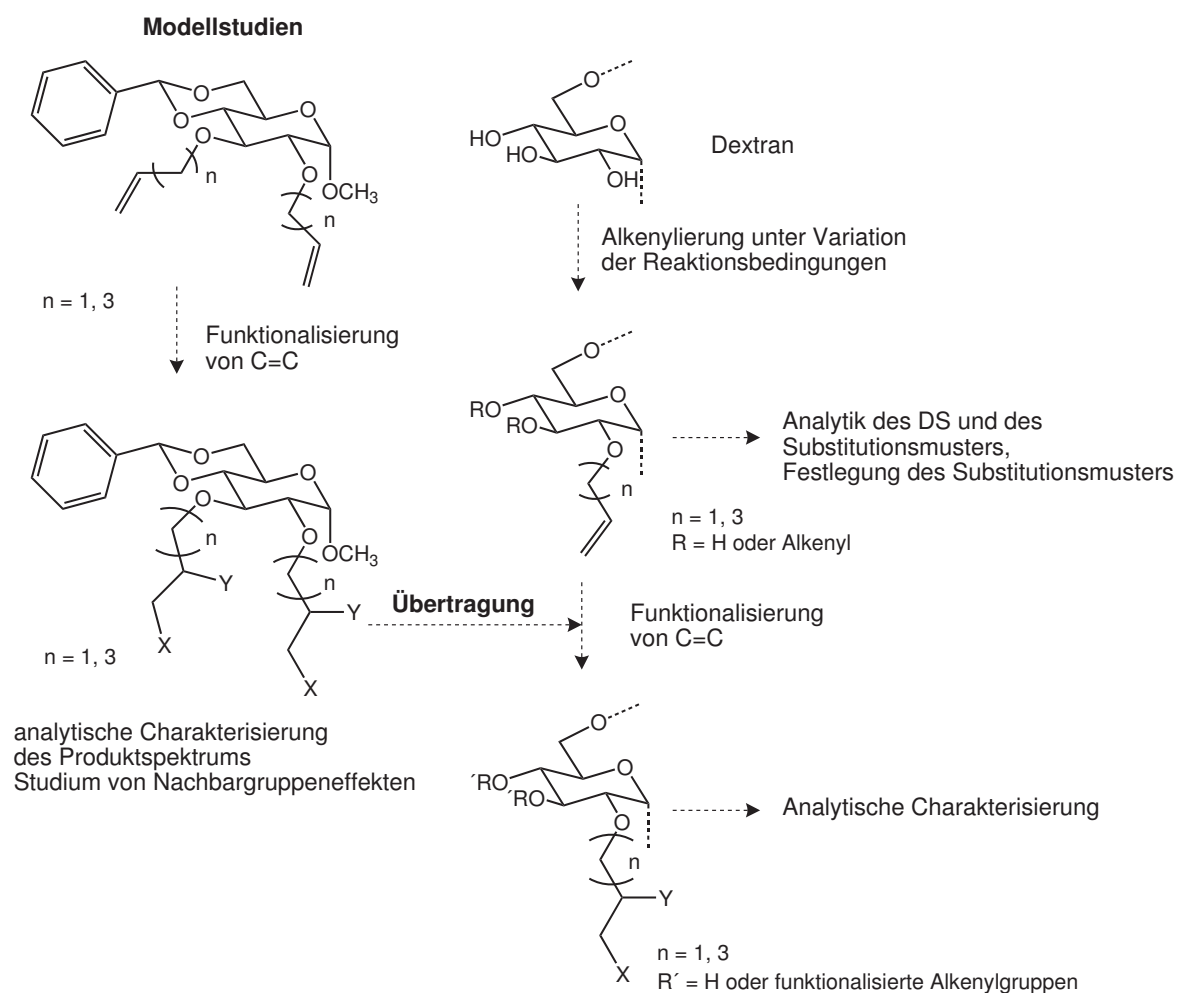


Abb. 4-1 Konzept der vorliegenden Arbeit. Modellstudien der C=C Funktionalisierung an geschützten Alkenylglucosen und Übertragung erfolgreicher Reaktionen auf Alkenyldextrane.

Die Methylglucoside **3** und **4** besitzen jeweils zwei vicinale Alkenylgruppen, so dass die Untersuchung von Nachbareffekten möglich ist. Die Positionen 1-OH und 6-OH sind durch das α -Methylglucosid bzw. Benzylidenacetal analog zum hauptsächlich α -(1 \rightarrow 6) verknüpften Dextran nicht für Reaktionen zugänglich.

4.1 Synthese geschützter Alkenylmethylglucoside

Benzaldehyd oder das korrespondierende -dimethylacetal reagieren mit Hexopyranosiden unter bevorzugter Bildung der 4,6-*cis*- oder 4,6-*trans*-Ringsysteme, wobei der Phenylrest stets die äquatoriale Position einnimmt^[142]. Die Benzylidenierung ist daher eine etablierte Methode zur selektiven Maskierung von 4-OH und 6-OH des Methylglucopyranosids, da das gebildete Methyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**2**) stabiler als die übrigen Isomere (2,3- oder 3,4-Acetale) ist. Die Synthese erfolgt säurekatalysiert (*p*-Toluolsulfonsäure), wobei durch stetigen Entzug des bei Verwendung von Benzaldehyddimethylacetal gebildeten Methanols im Vakuum das Gleichgewicht der Reaktion zugunsten des Produktes verschoben wird^[143]. In jüngster Zeit wurde auch über die Synthese in Ionischen Flüssigkeiten (z.B. 3-Butyl-1-methylimidazolium-tetrafluoroborat) mit bis zu 99 % Ausbeute berichtet^[144]. Die Modellsubstanz Methyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**2**) selbst besitzt ebenfalls interessante Eigenschaften, welche einen Einsatz z.B. als Gelbildner für Drug Delivery- und Enzymimmobilisationsstudien^[145-147] denkbar machen.

Das Benzylidenmethylglucosid **2** wird in einer nachfolgenden Reaktion mittels Alkenylhalogenid (Allylbromid oder 1-Brom-5-penten) in Position 2 und 3 verethert, so dass die vollständig geschützten Glucosederivate Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) und Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**) als Modellsubstanzen erhalten werden (Abb. 4-2). Aufgrund ihres eher lipophilen Charakters lassen sich die Derivate gut mit organischen Lösungsmitteln extrahieren und säulenchromatographisch reinigen. Eine Röntgenstrukturanalyse von Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) wurde bereits veröffentlicht^[57].

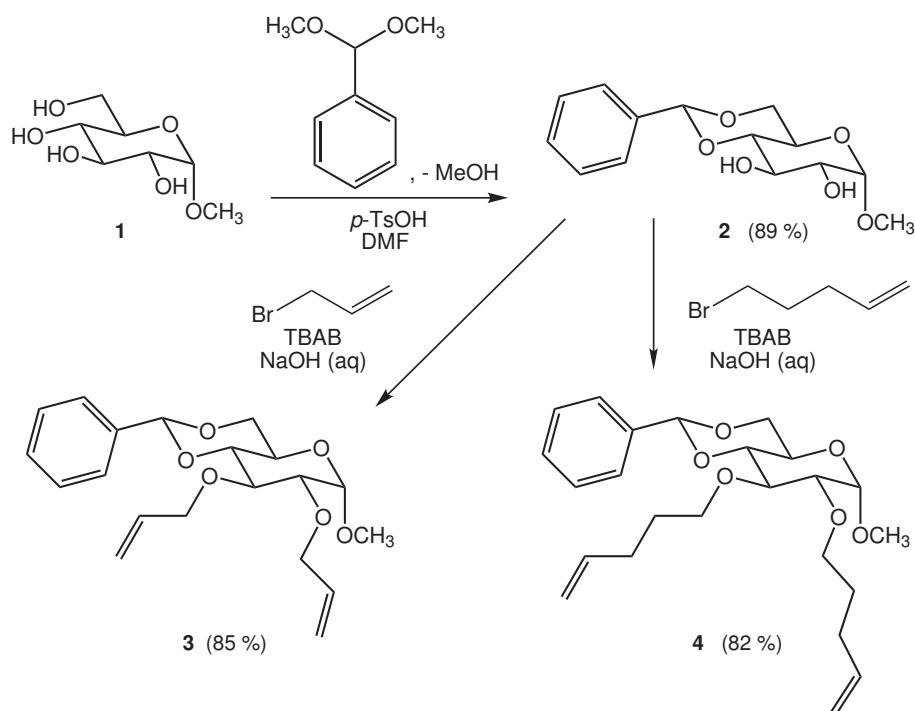


Abb. 4-2 Synthese der Modellsubstanzen: Benzylidenierung von Methyl- α -D-glucopyranosid (**1**) zu Methyl-4,6- O -benzyliden- α -D-glucopyranosid (**2**) und Umsetzung zu Methyl-2,3-di- O -allyl-4,6- O -benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) bzw. Methyl-4,6- O -benzyliden-2,3-di- O -(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**).

4.2 Epoxidierung - Stand der Forschung

Die Epoxidierung ungesättigter Verbindungen (Abb. 3-10, d) kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Zu nennen ist an dieser Stelle die Epoxidierung von Alkenen mit Peroxycarbonsäuren, die so genannte *Prilezhaev-Reaktion*^[122]. Das sehr elektrophile Sauerstoffatom der Peroxogruppe einer Persäure wird dabei an die π -Bindung des Alkens (*syn*-stereospezifisch) addiert (Abb. 4-3). Am häufigsten wird *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) als Oxidationsmittel eingesetzt, da diese kommerziell erhältlich, relativ stabil, nicht zu explosiv und daher gut zu handhaben ist. Die Epoxidierung von Allylglykosiden mit *m*-CPBA nutzten Beier *et al.*, um hernach durch Behandlung mit Perchlorsäure das Diol und so den Naturstoff Isofloridosid (2,3-Dihydroxypropyl- α -D-galactopyranosid) zu erhalten^[148]. Dittmann *et al.* epoxidierten *O*-Alkenylether (allyl, octenyl) von β -Cyclodextrinderivaten mit *m*-CPBA^[149] in Chloroform mit ca. 70 %iger Ausbeute. Durch eine *N*-nucleophile Ringöffnungsreaktion an einer Aminopropyl-Silicaphase wurden die Cyclodextrine kovalent gebunden und die erhaltene stationäre Phase für enantioselektive HPLC-Trennungen eingesetzt. Lin *et al.* oxidierten Allylcellulose mit Peressigsäure in CH_2Cl_2 zur Glycidylcellulose^[195] und charakterisierten die Produkte mittels

FTIR, NMR, TGA und GPC. Der DS der Produkte nahm dabei leicht ab ($DS_{\text{allyl}} = 2,80$; $DS_{\text{glycidyl}} = 2,58$) und es kam durch auftretende Ringöffnungsreaktionen der Oxirane (\rightarrow Diole) zu Veresterungen mit der entstandenen Essigsäure (\rightarrow Acetate). Zudem trat eine partielle Depolymerisation auf, was sich in einer bimodalen Verteilung (GPC) der Glycidylcellulose sowie geringerem M_w äußerte.

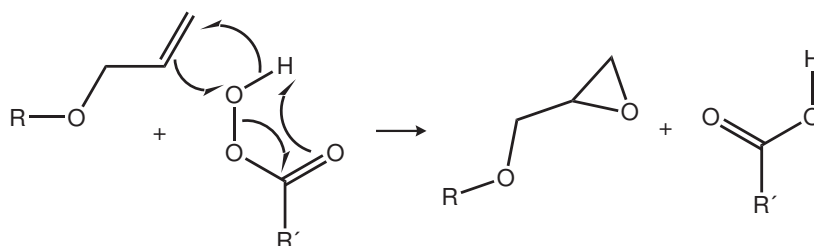


Abb. 4-3 Epoxidierung von Allylethern durch Percarbonsäuren.

Als Weiterentwicklung der *Prilezhaev*-Reaktion kann die *Sharpless*-Epoxidierung betrachtet werden. Diese asymmetrische Oxidation von Allylalkoholen nutzt *tert*-Butylhydroperoxid in Gegenwart von Titan(IV)-isopropylat und (+)- bzw. (-)-Diethyltartrat als Reagenz. Die Reaktion ist hoch enantioselektiv^[122] und kann durch die Wahl des Diethyltartrat-Enantiomers gelenkt werden.

Als umweltfreundliches Reagenz ist Wasserstoffperoxid in wässrig-alkalischem Milieu insbesondere für ein hydrophiles Polysaccharid eine interessante Variante für Epoxidierungen^[150]. Die Reaktion erfolgt zumeist zweiphasig unter Zusatz eines Phasentransferkatalysators und ist nicht nur für einfache Olefine geeignet, sondern auch kompatibel mit Estern oder Ethern. Viele Beispiele finden sich bei Houben^[151]. Wu *et al.* epoxidierten Diallylether mit H_2O_2 zum Allylglycidylether bzw. weiter zum Diglycidylether unter Katalyse eines Titansilicates in Acetonitril oder Aceton^[152]. Neben den gewünschten Oxiranen traten durch Solvolyse Nebenprodukte wie Allylalkohol oder Glycerinallylether auf. Timmermans *et al.* führten umfangreiche Untersuchungen zur Darstellung und Epoxidierung von Allyl- und Allylglycidylstärken durch und erzielten mit CH_3CN/H_2O_2 die besten Ergebnisse hinsichtlich Umsatz und Vermeidung von Kettenabbau^[153].

Als sehr potente Epoxidierungsreagenzien haben sich Dioxirane erwiesen^[154]. Sie können entweder in einer Vorreaktion synthetisiert und isoliert oder direkt *in situ* generiert werden^[155]. In isolierter Form wirken sie als stöchiometrische Epoxidierungsmittel, *in situ*

generiert erfolgt die Umsetzung des Reaktionspartners zum Epoxid katalytisch. Vorzüge der letzteren Variante sind Schnelligkeit, relativ milde Bedingungen (Raumtemperatur) und die Vermeidung des Isolierungsschrittes der potentiell explosiven Peroxide. Enthaltene Hydroxygruppen stören die Epoxidierungsreaktion nicht. Dimethyldioxiran (DMD) ist bei weitem das häufigste Dioxiran, das zur Epoxidierung eingesetzt wird. Zur *in situ* Herstellung wird Aceton mit Kaliumhydrogenmonoperoxosulfat (KHSO_5 , Oxone®, Caro'sches Salz) in alkalischer wässriger Lösung umgesetzt^[156] (siehe Abb. 4-4).

Eine Abwandlung der Epoxidierung mit DMD ist der Einsatz des noch reaktiveren (Trifluormethyl)methyldioxirans (TFD), welches analog durch Reaktion von 1,1,1-Trifluoraceton und KHSO_5 *in situ* generiert wird^[157,158].

Charette *et al.* epoxidierten *trans*-2-Butenylglucoside mit verschiedenen Reagenzien und untersuchten das molare Verhältnis der entstandenen Diastereomere^[159]. Neben der wenig erfolgreichen Übergangsmetallkatalyse setzten sie Persäuren (*m*-CPBA) sowie Dioxirane (DMD) ein. Sowohl DMD als auch *m*-CPBA führten zu den gewünschten Epoxiden. Dabei begünstigte eine Hydroxygruppe in Position 2 der Glucose offenbar die Epoxidierung der Alkenylglucoside im Vergleich mit an *O*-2 geschützten Derivaten.

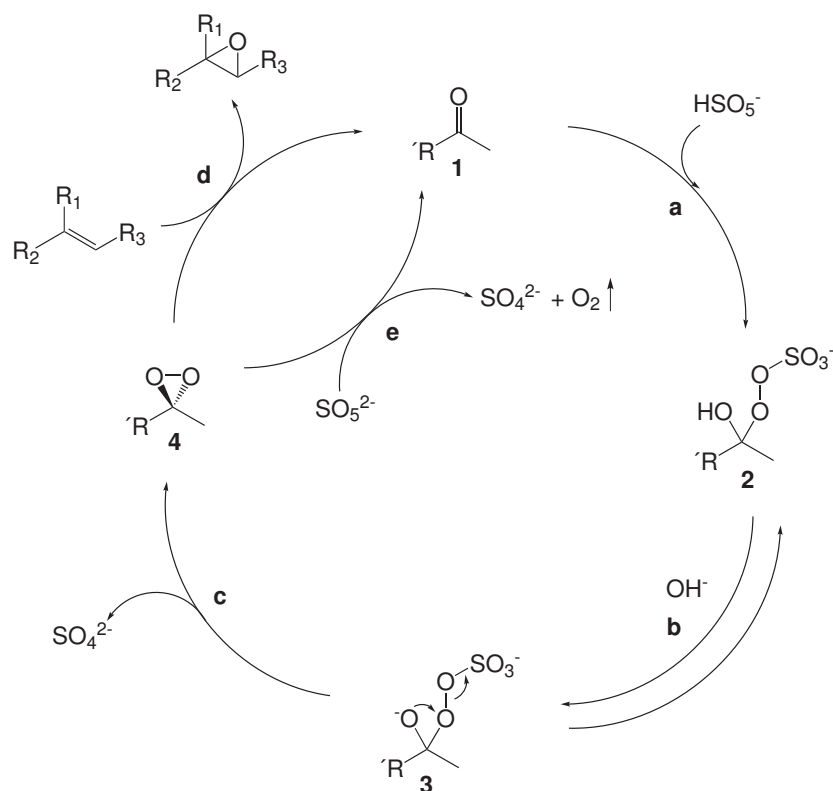


Abb. 4-4 Bildung von Dimethyldioxiranen (4) durch Reaktion von Peroxymonopersulfat mit Ketonen (1, a) in alkalischem Medium sowie Epoxidierung ungesättigter Verbindungen (d) (nach^[156]).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Epoxidierung mit H_2O_2 , *m*-CPBA, DMD und TFD untersucht (siehe Kapitel 4.3).

4.3 Epoxidierung der Alkenyl-Modellsubstanzen

Für die Epoxidierung der Doppelbindungen der Modellsubstanzen **3** und **4** wurden H_2O_2 , *m*-CPBA und verschiedene Dioxirane erprobt. Eine Übersicht über durchgeführte Reaktionen und ihren Erfolg zeigt Tab. 4-1, die Produkte und mögliche Nebenprodukte der Reaktion am Beispiel von **3** sind in Abb. 4-5 dargestellt.

Wasserstoffperoxid

Das umweltfreundliche Wasserstoffperoxid (30 %) in alkalischem Acetonitril-Medium ist als Epoxidierungsreagenz bereits bei verschiedenen Anwendungen erfolgreich zum Einsatz gekommen^[150,153]. In Hinblick auf eine „Green Chemistry“ ist sein Einsatz sehr attraktiv, da es bei der Reaktion zu Wasser reduziert wird und keine bedenklichen Nebenprodukte anfallen.

In einem typischen Ansatz wurde Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) in wässrig alkalischem Milieu ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$) suspendiert, mit Acetonitril versetzt und binnen einer Stunde 30 %iges H_2O_2 in mehreren Portionen hinzugegeben. Die Aufarbeitung erfolgte durch Toluol-Extraktion der zuvor mit NaCl gesättigten wässrigen Reaktionsmischung. Die einzelnen Versuche sind in Tab. 4-1 aufgelistet. Die Produktspektren inklusive Oxiranöffnungen durch Wasser sowie die zu berücksichtigende Stereochemie der Epoxide sind in Abb. 4-5 und Abb. 4-6 dargestellt.

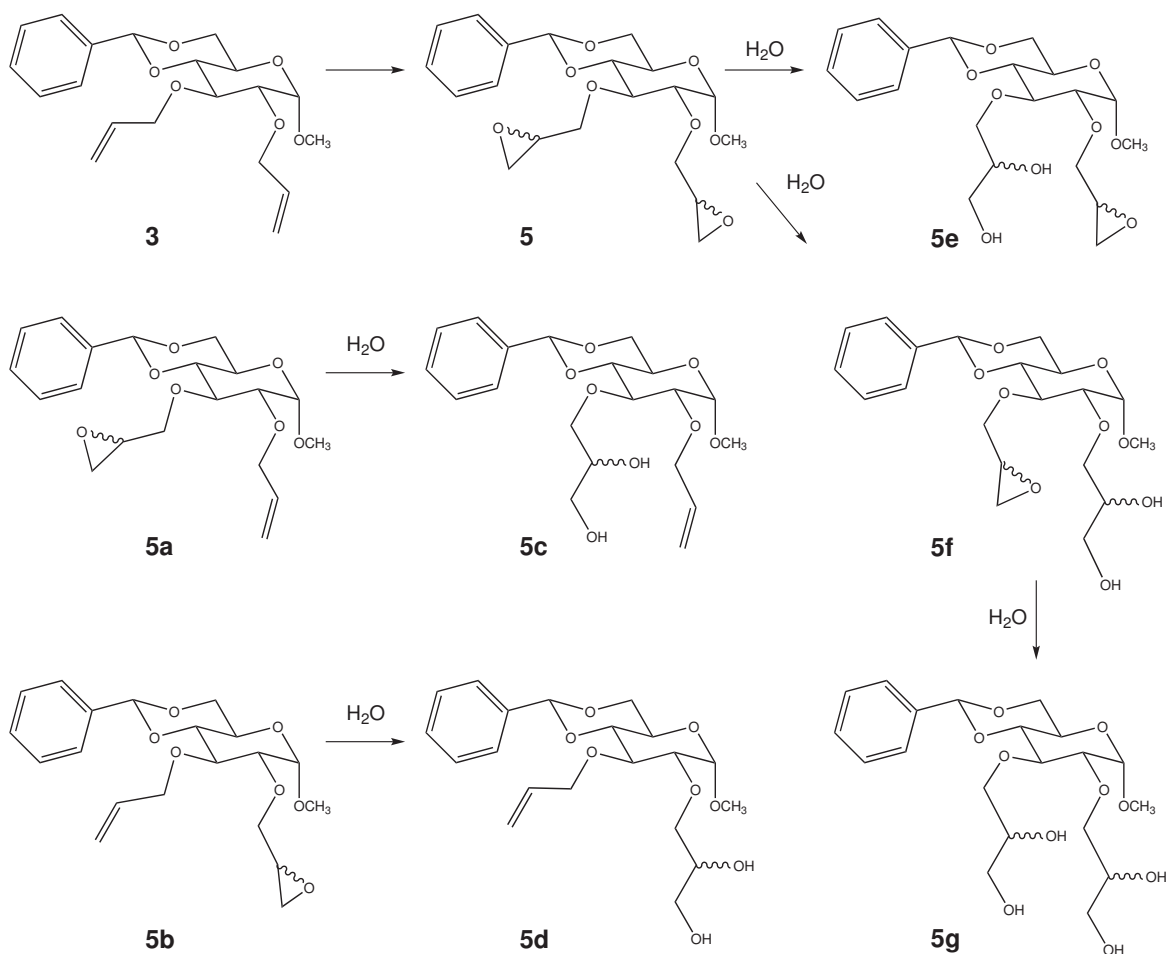


Abb. 4-5 Produktspektrum der Epoxidierung der Alkenylmodellsubstanzen am Beispiel von **3**. Zielprodukt Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**), **a,b**: mono-epoxy-mono-alkenyl-Isomere; Produktspektrum der Oxiranöffnung durch Wasser: **c,d**: mono-alkenyl-mono-dihydroxy-Isomere; **e,f**: mono-epoxy-mono-dihydroxy-Isomere; **g**: di-dihydroxy. Von jedem Produkt gibt es zwei bzw. vier Stereoisomere.

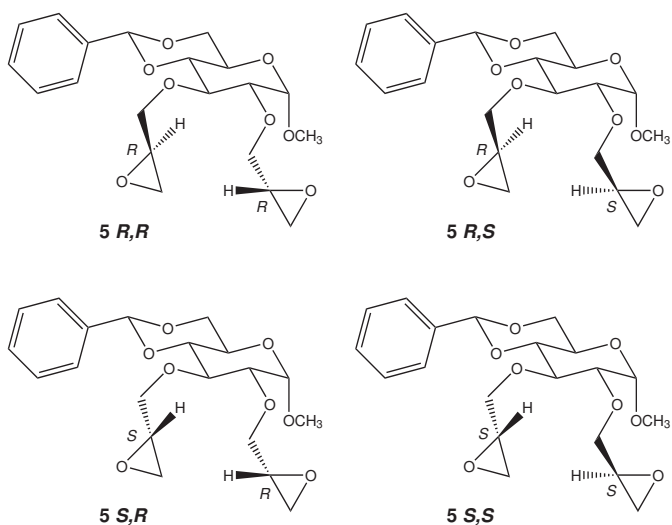


Abb. 4-6 Stereochemie der Oxirangruppen am Beispiel von **5**.

4 Reaktionen an Glucose-Modellsubstanzen

Tab. 4-1 Übersicht über Epoxidierungsreaktionen von Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**).

AV Nr.	Reagenz	Äq/ DB	Zusätze, Lösungsmittel	T [°C]	t [h]	Ausbeute an 5 [%]
26	H ₂ O ₂	2,1	CH ₃ CN, Wasser, NaHCO ₃ , Na ₂ CO ₃	RT	19	kaum Umsatz 3
27	H ₂ O ₂	2,1	CH ₃ CN, Wasser, NaHCO ₃ , Na ₂ CO ₃ , TBAB (0.5 Äq./DB)	70	2	kein Umsatz 3
28	H ₂ O ₂	2,1	CH ₃ CN, Wasser, NaHCO ₃ , Na ₂ CO ₃	RT	47	kaum Umsatz 3
29	H ₂ O ₂	2,1	CH ₃ CN, Wasser, NaHCO ₃ , Na ₂ CO ₃	40	42	kein Umsatz 3
32	H ₂ O ₂	2,5	CH ₃ CN	RT	68	kein Umsatz 3
33	H ₂ O ₂	2,5	CH ₃ CN	60	22	kaum Umsatz 3
43	<i>m</i> -CPBA	1,5	CH ₂ Cl ₂	50	22	Umsatz 3 ~ 55
44	<i>m</i> -CPBA	1,6	CH ₂ Cl ₂	50	72	Umsatz 3 ~ 65
45	<i>m</i> -CPBA	1,6	CH ₂ Cl ₂	RT	72	Umsatz 3 ~ 80
47	DMD p > atm.	kat	CH ₃ CN, CH ₂ (OCH ₃) ₂ K ₂ CO ₃ , Aceton, Bu ₄ NHSO ₄	RT	21	39
48	DMD p > atm.	kat	CH ₃ CN, CH ₂ (OCH ₃) ₂ K ₂ CO ₃ , Aceton, Bu ₄ NHSO ₄	RT	22	10
62	DMD p > atm.	kat	Aceton, NaHCO ₃	-7 RT	1 24	65
65	DMD p > atm.	kat 2x	Aceton, NaHCO ₃	-7 RT	2x1 120	47

AV Nr.	Reagenz	Äq/ DB	Zusätze, Lösungsmittel	T [°C]	t [h]	Ausbeute an 5 [%]
66	DMD p > atm.	kat	Aceton, NaHCO ₃	-7 RT	2 120	58
TS 15	DMD p = atm.	kat 2x	Aceton, NaHCO ₃	-7 RT	2x1 96	30
TS 4	DMD p > atm.	kat	Aceton, NaHCO ₃	-7 RT	3 12	43
TS 11	DMD p > atm.	kat	Aceton, NaHCO ₃	-7 RT	3 12	34
74	DMD p > atm.	kat	Aceton, NaHCO ₃	-7 RT	2 24	61

DB = Doppelbindung, kat = katalytische Umsetzung der DB zum Epoxid durch *in situ* gebildetes Dioxiran; H₂O₂ = 30 %ig, Umsatz = Reaktion von **3** zu verschiedenen (partiell) epoxidierten und geöffneten Produkten, Ausbeute = **5** [% d. Th.] nach säulenchromatographischer Isolierung, Bu₄NHSO₄ = Phasentransferkatalysator; p > atm. / p = atm.: ohne/mit Druckausgleich geführte Reaktion

In den ESI-Massenspektren der Rohprodukte der mit H₂O₂ epoxidierten Ansätze AV 26, 28 und 33 (Tab. 4-1) konnten neben dem Hauptsignal $[M+Na]^+ = m/z$ 385 des Edukts **3** auch einfach epoxidierte Verbindungen (Methyl-3-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden-2-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5a**) bzw. Methyl-2-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5b**), $[M+Na]^+ = m/z$ 401) sowie in geringer Menge die Zielsubstanz Methyl-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**5**) ($[M+Na]^+ = m/z$ 417) nachgewiesen werden (Massenzahlen siehe Tab. 4-2). Eine Öffnung der Oxirane durch Wasser kann zur Entstehung von Diolen führen (siehe Abb. 4-5, **5c-5g**) und würde im ESI-MS im Vergleich zu den Oxiranen um $m/z = +18$ erhöhte Signale liefern (siehe Tab. 4-2). Diese Substanzen wurden jedoch bei der Epoxidierung mit Wasserstoffperoxid bei AV 26, 28 und 33 (Tab. 4-1) nicht detektiert.

Bei der Interpretation von ESI-Massenspektren muss jedoch immer die unterschiedliche Komplexierungsfähigkeit verschiedener Derivate und damit die nicht identische Sensitivität der Methode für verschiedene Substanzen bedacht werden. ¹H/¹³C-NMR-Messungen sowie DC-Untersuchungen, welche eine Abschätzung der quantitativen Zusammensetzung des Reaktionsgemisches eher erlauben, zeigten keine neuen Signale

durch Epoxypropylether. Epoxidierungsprodukte sind bei AV 26, 28 und 33 folglich nur in Spuren entstanden und werden im ESI-MS überrepräsentiert.

Tab. 4-2 Massenzahlen der Epoxidierungsprodukte von Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) und Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**). Legende der Produkte: **a,b**: mono-epoxy-mono-alkenyl; **c,d**: mono-alkenyl-mono-dihydroxy; **e,f**: mono-epoxy-mono-dihydroxy; **g**: di-dihydroxy. Strukturen siehe Abb. 4-5.

Edukt	Produkte	M	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺
		g/mol	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
3		362	385	401
	5	394	417	433
	5a, 5b	378	401	417
	5c, 5d	396	419	435
	5e, 5f	412	435	451
	5g	430	453	469
4		418	441	457
	6	450	473	489
	6a, 6b	434	457	473
	6c, 6d	452	475	491
	6e, 6f	468	491	507
	6g	486	509	525

Die Epoxidierung von **3** mit Wasserstoffperoxid konnte trotz umfangreicher Variation der Bedingungen (Temperatur, Zeit, Äquivalente H₂O₂, pH-Wert, Zusatz des Phasentransferkatalysators TBAB, siehe Tab. 4-1, AV 26-29, 32, 33) zu keinem signifikanten Umsatz zu **5** gesteigert werden, weshalb von dieser Methode Abstand genommen wurde. Möglicherweise sind die Polaritätsunterschiede zwischen **3** und wässrigem H₂O₂ zu groß und der Phasentransfer durch Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) nicht ausreichend, so dass es nicht zur erfolgreichen Reaktion kommt. Eine Entschützung der Positionen 4 und 6 zum Alkohol könnte hier möglicherweise Abhilfe schaffen, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt.

Metachlorperbenzoesäure m-CPBA

In einem typischen Ansatz wurde **3** in trockenem Dichlormethan gelöst, mit *m*-CPBA versetzt und gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung mit Wasser gewaschen und die organische Phase im Stickstoffstrom zur Trockene eingeeengt. Die einzelnen Versuchsansätze finden sich in Tab. 4-1, AV 43-45. Zur Analytik wurde der Rückstand an einer Kieselgelsäule aufgetrennt und die Fraktionen mittels DC, ESI-MS und NMR untersucht. Auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigte sich ein großes Produktspektrum aus einfach (**5a**, **5b**) und zweifach (**5**) epoxidierten Produkten (siehe Abb. 4-5) sowie vielen weiteren Nebenprodukten. Neue Signale in den ¹H-NMR Spektren wie Multipletts bei 3,22 ppm und 2,75 ppm bei gleichzeitiger starker Abnahme der Resonanzen in den Bereichen der Allylgruppen im ¹H- und ¹³C-NMR (vgl. auch Abb. 4-9) bewiesen die Anwesenheit von Oxirangruppen. ESI-MS-Messungen zeigten Signale, welche dem Natrium- $[M+Na]^+ = m/z$ 417 und Kalium-Addukt $[M+K]^+ = m/z$ 433 des gewünschten Produktes **5** entspricht (siehe Tab. 4-2).

Bei der Verwendung von Metachlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) zur Epoxidierung der Alkenylgruppen entsteht *m*-Chlorbenzoesäure, welche ein saures Milieu (pH 3) erzeugt (siehe Abb. 4-3). Hierdurch kann eine Abspaltung der säurelabilen Benzyliden-Schutzgruppe erfolgen oder die Oxirane zu den Diolen geöffnet werden, was zu den auf dem DC beobachteten unerwünschten Nebenprodukten geführt haben kann. Jedoch wurden solche polareren Produkte bei ESI-MS-Messungen nicht bestätigt.

Die Strategie der *m*-CPBA Epoxidierung wurde aufgrund der auftretenden Nebenprodukte für die Modellsubstanzen **3** und **4** nicht weiter optimiert. Eine Epoxidierung von Allyl-Polysacchariden mit *m*-CPBA kann hingegen erfolgversprechend sein, da hier keine säurelabilen Schutzgruppen zu beachten sind und die glykosidischen Bindungen hinreichend säurestabil sind. Bei Alkenyldextranen mit hohem DS ist der Einsatz dieses unpolaren Epoxidierungsreagenzes möglicherweise die Methode der Wahl.

Dioxirane

Für die Epoxidierung der Modellsubstanzen **3** und **4** wurde Dimethyldioxiran (DMD) bzw. (Trifluormethyl)methyldioxiran (TFD) direkt *in situ* generiert. Hierzu wurden verschiedene Arbeitsvorschriften^[154-156,160] überprüft und modifiziert. Allen gemein ist die Umsetzung von Aceton bzw. 1,1,1-Trifluoraceton mit Kaliumhydrogenmonoperoxosulfat (KHSO₅, Oxone[®]) in alkalischer wässriger Lösung (siehe Abb. 4-4).

Die Durchführung mit einer Ansatzgröße von bis zu 1 g (2,76 mmol) **3** variierte u. a. im Versuchsaufbau: die Reaktion wurde teils mit, teils ohne Druckausgleich durchgeführt. Letztere Variante im Kolben mit Septum zeigte - vermutlich aufgrund der durch den entstehenden Überdruck verhinderten Zersetzung des Dioxirans - zumeist eine größere Reaktionseffizienz. Variation von Druck, Temperatur, Zeit und Lösemittel sowie die erhaltene Ausbeute an **5** sind in Tab. 4-1 gegenübergestellt.

Die Erfolgskontrolle der Reaktion erfolgte generell über DC sowie nach säulenchromatographischer Trennung der Produkte durch ESI-MS-Messungen der Fraktionen sowie ATR-IR- und NMR-Aufnahmen.

Angelehnt an Adam *et al.*^[155] wurden je ca. 50 mg **3** in Acetonitril/ Dimethoxymethan (2/1, v/v) gelöst, mit 0,1 M K₂CO_{3(aq)} und Aceton versetzt und Tetrabutylammoniumhydrogensulfat als Phasentransferkatalysator hinzugegeben. Durch ein Septum wurden simultan binnen 2 h gleiche Volumina einer Lösung von KHSO₅ in 0,4 mM EDTA (279 mg KHSO₅/mL EDTA) sowie K₂CO_{3(aq)} (281 g/L) bei Raumtemperatur hinzugetropft und gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch Toluol-Extraktion (siehe Tab. 4-1, Einträge AV 47-64). Da mit diesen Bedingungen keine zufrieden stellende Ausbeute an **5** (max. 39 %) erreicht werden konnte und der apparative bzw. Reagenzien-Aufwand unverhältnismäßig erschien, wurde nach einer einfacheren Methode gesucht.

Broshears *et al.*^[160] beschreiben eine simple Anweisung zur Epoxidierung mit Oxone[®], bei welcher Aceton direkt als Lösungsmittel verwendet wird. Zur pH-Erhöhung wird dieser Lösung festes NaHCO₃ zugesetzt. Zu dieser Suspension wird im geschlossenen System über ein Septum eine wässrige Lösung von KHSO₅ (0,27 g/mL) bei 0 °C langsam zugetropft und anschließend bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt durch Extraktion des Reaktionsgemisches mit Diethylether. Durch die abgesenkte Temperatur während der KHSO₅-Zugabe wird einer Zersetzung des DMD entgegengewirkt. Diese Vorschrift wurde auf **3** angewandt (Tab. 4-1, Einträge AV 62-74). Bei vereinfachter Durchführung konnte die Ausbeute an **5** auf diese Weise bis auf 65 % gesteigert werden. Auch bei der homologen Modellsubstanz **4** konnte auf diese Weise mit 51 % eine zufrieden stellende Ausbeute an **6** erreicht werden.

Der bisher beschriebene Reaktionsaufbau erfordert abschließend die Extraktion der Produkte. Um eine Übertragung auf Polysaccharidalkenylether zu ermöglichen, sollte

dieser Schritt vermieden werden. Bei Polysaccharidethern mit einem $DS < 3$ liegt ein komplexes Substitutionsmuster vor. Dieses Gemisch aus verschiedenen Molekülen zeigt je nach DS und Verteilung der Substituenten im Polymer (siehe Abschnitt 5.3) unterschiedliche physikalische Eigenschaften. Eine quantitative Extraktion der ggf. nur partiell epoxidierten Alkenyldextrane wäre daher äußerst schwierig, weshalb diese durch Fällung oder Dialyse isoliert werden müssten.

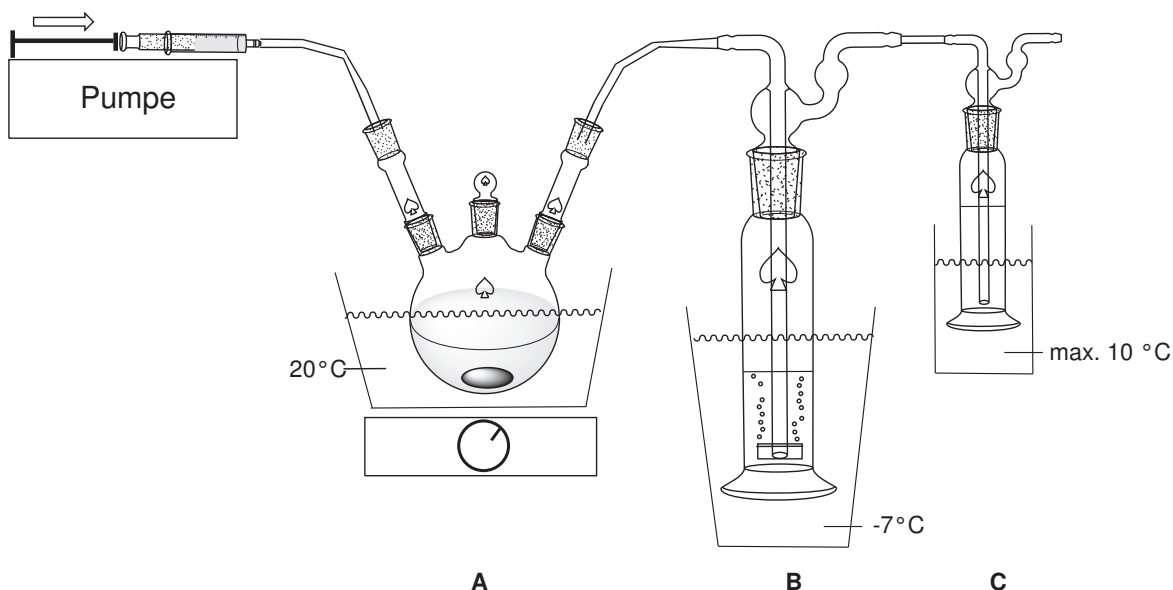


Abb. 4-7 Versuchsaufbau zur *in situ* Synthese der Dioxirane DMD und TFD und die weitere Epoxidierung von Substanzen. **A:** Bildung des Dioxirans aus KHSO_5 und Aceton bzw. 1,1,1-Trifluoracetonhydrat; **B:** Vorlage des gelösten Alkenylderivats; **C:** Waschflasche mit Thioanisol (Methylphenylsulfid) zum Abfangen des Dioxiran-Überschusses; weitere Erläuterung siehe Text.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde ein alternativer Versuchsaufbau gewählt (Abb. 4-7), bei dem das *in situ* gebildete gasförmige Dioxiran in die Reaktionszone übergetrieben wird, in welcher sich das z.B. in Dichlormethan gelöste Edukt befindet^[158]. Die Aufarbeitung beschränkt sich einzig auf die Abtrennung des Lösungsmittels, was bedeutend zeiteffizienter ist. Eine Übersicht über die so erzielten Ergebnisse zeigt Tab. 4-3.

4 Reaktionen an Glucose-Modellsubstanzen

Tab. 4-3 Übersicht Epoxidierung von **3** und **4** mit DMD und TFD in der in Abb. 4-3 dargestellten Versuchsanordnung.

Edukt	Reagenz	Zusätze	T	t	Ausbeute	
		Lösungsmittel	[°C]	[h]	[%]	
AV 100	3	TFD <i>in situ</i>	EDTA, NaHCO ₃ , CH ₂ Cl ₂	-7	2,5	35 (5a/b) 5 (5)
AV 102	3	TFD <i>in situ</i>	EDTA, NaHCO ₃ , CH ₂ Cl ₂ , Glasperlen	-7	2	37 (5a/b) 7 (5)
AV 106	4	TFD <i>in situ</i>	EDTA, NaHCO ₃ , CH ₂ Cl ₂	-7	2	< 20 (6) n. b.
AV 108	3	DMD <i>in situ</i>	1) EDTA, NaHCO ₃ , CH ₂ Cl ₂	1) -7	1) 2	< 5 (5) n. b.
		DMD <i>in situ</i>	2) EDTA, NaHCO ₃	2) -7	2) 2	< 5 (5) n. b.
AV 109	3	DMD <i>in situ</i>	in V-Vial, EDTA, NaHCO ₃	-7	1	< 5 (5) n. b.
AV 110	4	DMD <i>in situ</i>	in V-Vial, EDTA, NaHCO ₃	-7	0,5	< 5 (6) n. b.
AV 111	3	DMD <i>in situ</i>	EDTA, NaHCO ₃ , CH ₂ Cl ₂ , Glasperlen, Spritzenpumpe 30 mL/h	-7	2,5	< 5 (5) n. b.

DB = Doppelbindung, kat. = katalytische Umsetzung der Doppelbindung durch *in situ* gebildetes Dioxiran; Ausbeute nach Säulenchromatographie, n.b. = genaue Ausbeute nicht bestimmt, abgeschätzt nach Verhältnis der Substanzen auf dem DC.

Aufgrund der höheren Elektrophilie des 1,1,1-Trifluoracetons im Vergleich zu Aceton, erfolgt die Bildung des (Trifluormethyl)methyldioxirans (TFD) wesentlich schneller als die des DMD^[155]. Selbst deaktivierte Kohlenwasserstoffe oder Olefine werden mit TFD effizient oxidiert^[158]. Die höhere Reaktivität sollte somit einen gesteigerten Umsatz zum gewünschten epoxidierten Produkt erzielen. Das schlecht wasserlösliche und extrem flüchtige 1,1,1-Trifluoraceton wurde durch eine Vorreaktion in seine Hydratform überführt. Auf diese Weise wird ein mehrphasiges System, welches den Einsatz von Phasentransfer-Reagenzien erforderte, umgangen. Eine Isolierung des flüchtigen TFD kann ebenfalls unterbleiben, da das *in situ* gebildete Gas direkt in die Reaktionszone geleitet

wird. Überschüssiges Reagenz wird abgeleitet, so dass sich die Isolierung des Produktes auf die Abtrennung des Lösemittels beschränkt. Ein Problem ist die unter Sauerstoffabspaltung potentiell stattfindende Zersetzungsreaktion der *in situ* gebildeten Dioxirane (siehe Abb. 4-4, e), was die Effizienz der Epoxidierung herabsetzt und einen großen Überschuss sowie kontinuierliche Nachdosierung an wässriger KHSO_5 -Lösung erfordert. Viele Publikationen berichten über diese Zersetzung von KHSO_5 bei hohen pH-Werten durch den Angriff des SO_5^{2-} -Dianions auf ein gebildetes Dioxiran unter O_2 -Freisetzung und fordern daher bei *in situ*-Synthesen der Dioxirane eine rigide Kontrolle des pHs auf Werte um 7,5^[154]. Frohn *et al.*^[156] fanden hingegen eine höhere Effizienz der Dimethyldioxiran Bildung (Aceton-Epoxidierung) bei hohen pH-Werten (pH 12), was sich vermutlich durch die Propagation der Bildung des Oxy-Anions 3 durch OH^- erklären lässt (siehe Abb. 4-4, b). Der Schritt von 3 zu 4 (siehe Abb. 4-4) könnte demnach der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dioxiran-Bildung und damit der Epoxidierung des Alkenylderivates sein. Für die Modellsubstanzen **3** und **4** wurden daher weiterhin alkalische Bedingungen gewählt - auch um die säurelabile Benzyliden-Schutzgruppe nicht zu gefährden.

Die angefertigte offene Versuchsanordnung besteht aus zwei Reaktionszonen (siehe Abb. 4-7). In Reaktionszone **A** erfolgt die Bildung des DMD bzw. TFD durch Zutropfen einer konzentrierten, EDTA-haltigen wässrigen KHSO_5 -Lösung zu einer Vorlage aus Aceton bzw. 1,1,1-Trifluoracetonhydrat und festem NaHCO_3 . Durch den Einsatz einer Spritzenpumpe wird das leichtflüchtige Dioxiran (DMD, TFD) gleichmäßig über einen langen Zeitraum generiert und durch die entstehenden Gase (O_2 , CO_2) über eine feinporöse Glasfritte von unten in die Reaktionszone **B** übergetrieben. In dieser ist das Alkenyl-Derivat, z.B. in Dichlormethan, vorgelegt. Die Epoxidierung der Doppelbindungen erfolgt während des stetigen Strömens des Gases durch diese Probenlösung. Die Ausstattung der Reaktionszone **B** mit Glasperlen verlängert den Penetrationsweg des flüchtigen Dioxirans und führt so zu einem intensiveren Kontakt mit dem *O*-Alkenyl-Edukt. Überschüssiges Dioxiran wird in einer Kühlfalle, welche mit Thioanisol (Methylphenylsulfid) in Dichlormethan gefüllt ist (Reaktionszone **C**), reduziert und so das reaktive Oxidationsmittel abgefangen. Bereits Spuren organischer oder Metall-Verunreinigungen können das entstandene Dioxiran zersetzen. Daher muss bei der Durchführung auf sehr reine Reagenzien und frisch destillierte Lösungsmittel geachtet werden. Zudem werden zuvor sämtliche Glasgefäße mit wässriger EDTA-Lösung gewaschen, um verbliebene Metallionen zu komplexieren und zu entfernen.

Bei der Epoxidierung der Modellsubstanz **3** mit DMD wurden durch DC-Analytik vier verschiedene Reaktionsprodukte identifiziert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel zeigten ESI-MS-Messungen, dass es sich hierbei neben dem Edukt **3** um Mono-*O*-(2,3-epoxypropyl)-mono-*O*-allyl-Derivate (Stereoisomere **5a** und **5b**) sowie das gewünschte Zielprodukt handelte (siehe Abb. 4-5 und Tab. 4-3).

ATR-IR und $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR spektroskopische Messungen bestätigten die Identität von **5**. Problematisch im ^1H -NMR sind die diastereotopen Oxiran-Protonen (Abb. 4-8), die zu komplexen Signalaufspaltungen führen (siehe Abb. 4-6 und Abb. 4-9).

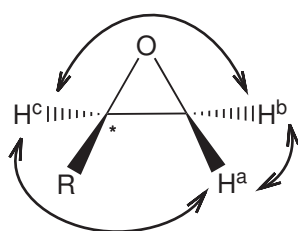


Abb. 4-8 Diastereotopie Protonen (H^a , H^b) von chiralen Epoxiden ($\text{R} \neq \text{H}$).

Auch bei der Epoxidierung des Pentenyl-Derivates **4** mit DMD bestätigten ESI-MS und NMR die Bildung des Produktes **6** (siehe 11.3.6). Die Epoxidierung von **3** mit TFD lieferte neben nicht umgesetztem Edukt die beiden isomeren Mono-Oxiran-Derivate **5a** und **5b** sowie das gewünschte Produkt **5** (AV 100, Abb. 4-10). Der Umsatz des Eduktes lag hier bei etwa 50 %.

Bei der Epoxidierung von **4** mit TFD wurde neben der nicht umgesetzten Ausgangssubstanz ein Gemisch aus drei Hauptprodukten und bis zu acht Minorprodukten erhalten (siehe DC, Abb. 4-10 B). ESI-MS-Messungen identifizierten die Hauptprodukte als **6a** bzw. **6b** sowie **6** (siehe Abb. 4-11). Grundsätzlich führt bei der Auswertung der ESI-Massenspektren das zeitgleiche Auftreten von Na^+ - und K^+ -Addukten zu Massenüberschneidungen (siehe Tab. 4-2), was die eindeutige Zuordnung eines m/z -Wertes zu einer bestimmten Struktur verhindert. Denkbar ist auch die hydrolytische Öffnung einer oder beider Epoxygruppen zum Diol (**5c-5g** bzw. **6c-6g**, Abb. 4-5). Allerdings wurden im ESI-MS keine zusätzlichen Signale beobachtet, weshalb hier nur von geringen Mengen auszugehen ist.

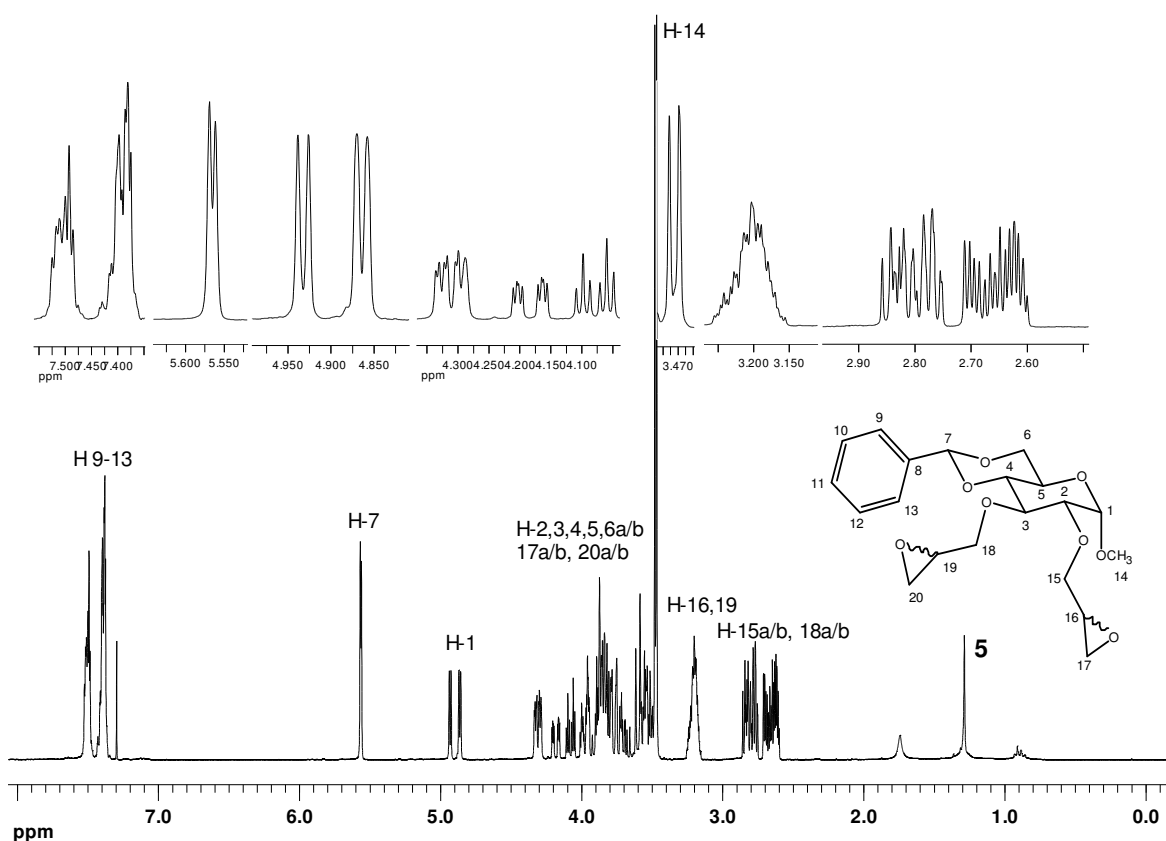


Abb. 4-9 Übersicht und vergrößerte Ausschnitte des ^1H -NMR-Spektrums (400 MHz, CDCl_3) von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) und Zuordnung der Signale.

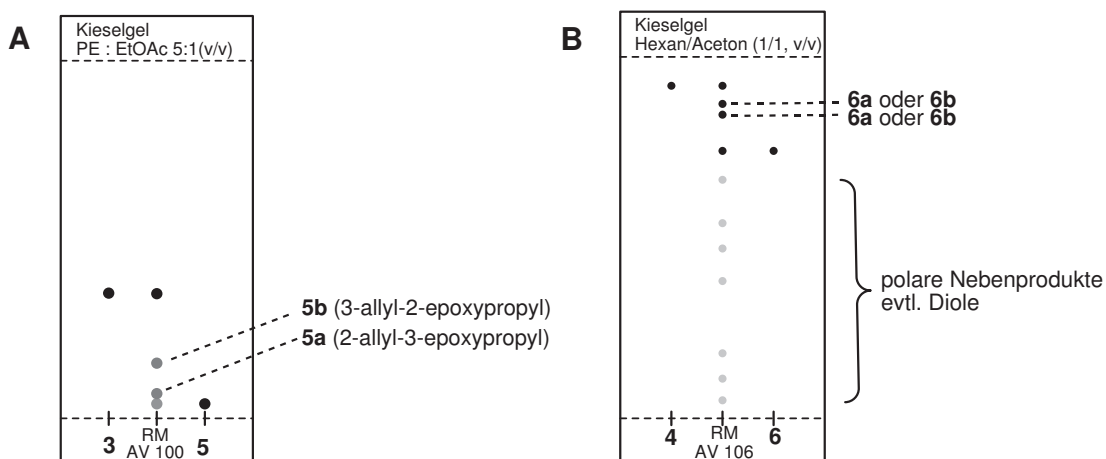


Abb. 4-10 Dünnschichtchromatogramme. **A:** Mit TFD epoxidiertes Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) (AV 100), **B:** Mit TFD epoxidiertes Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**) (AV 106), RM = Reaktionsmischung, PE = Petrolether, EtOAc = Ethylacetat.

Die Ursache der Produktvielfalt bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen ist möglicherweise im Auftreten der verschiedenen Stereoisomere zu suchen (siehe Abb. 4-5 und Abb. 4-6), welche mit identischen Massenzahlen im ESI-MS detektiert werden. Aufgrund der geringen Mengen konnten Minorprodukte jedoch säulenchromatographisch nicht isoliert und somit nicht analysiert werden.

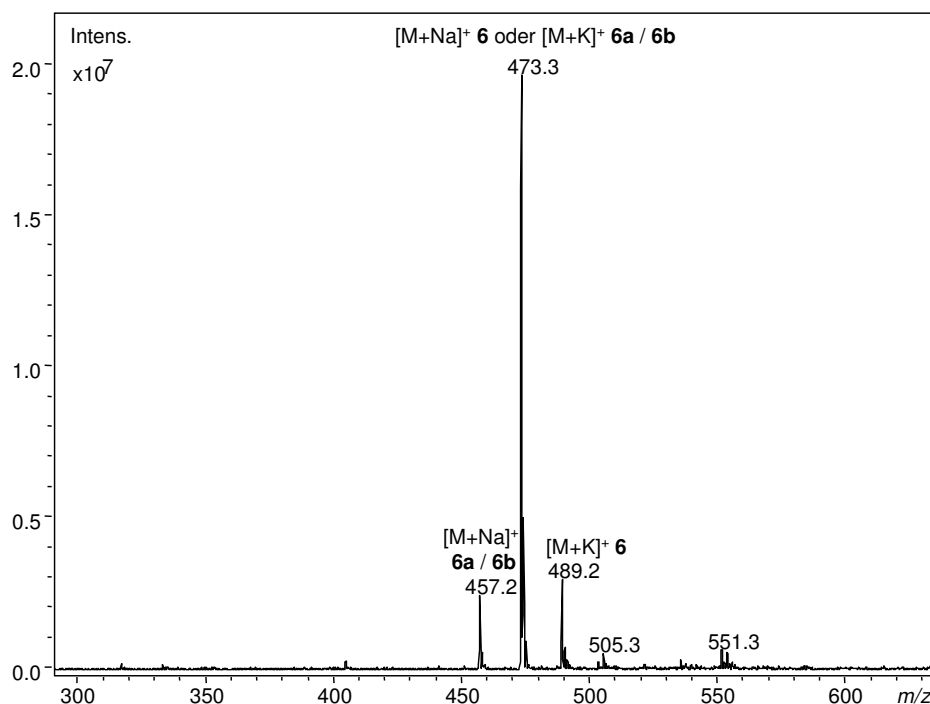


Abb. 4-11 ESI-MS (positive Mode) des Rohproduktes von mit TFD epoxidiertem Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**) (AV 106).

Ogleich die Ausbeuten an **5** bzw. **6** durch die Versuchsführung im offenen System gegenüber dem geschlossenen System in Kolben mit Septum nicht gesteigert werden konnten, wurden Allyldextrane auf diese Weise umgesetzt, um die generelle Durchführbarkeit der Epoxidierung mit Dioxiranen am Polysaccharid zu erproben (siehe Abschnitt 6.7.2).

4.4 Nucleophile Ringöffnung von Epoxiden – Stand der Forschung

Oxirane sind wertvolle Zwischenprodukte in der organischen Synthese. Durch nucleophile Ringöffnungen (Abb. 3-10, e) erhält man z.B. vicinale Dirole, Alkohole oder Ether. Erfolgt die Reaktion mit einem Stickstoffnucleophil, gelangt man zu Aminoalkoholen. Ein großer Überschuss des Amins ist dabei unerlässlich, um eine Weiterreaktion des Primärproduktes

mit noch nicht umgesetzten Oxiranen zu vermeiden. Eine Übersicht über die Ringöffnung von Alkylenoxiden durch Ammoniak, Amino- und Iminoverbindungen findet sich bei Houben/Weyl^[161]. Ein Patent zur Herstellung von α -Aminoalkanolen beschränkt sich auf die Umsetzung flüssiger oder gasförmiger dispergierbarer Alkylenoxide mit wässriger Ammoniaklösung in Gegenwart von Ammoniumsalzen^[162]. Chini *et al.* konnten die Ringöffnung von Cyclohexenoxiranen erfolgreich unter Zusatz von Metallsalzen als Katalysator (LiClO_4) mit Diethylamin, *iso*-Propylamin, *tert*-Butylamin, Benzylamin und Natriumazid durchführen^[163-165]. Miljkovic berichtete über die gelungene Reaktion von 1,6:2,3-Dianhydro- β -D-ribo-hexopyranose mit ethanolischem Ammoniak oder Dimethylamin in Autoklaven^[166]. Andriuzzi hingegen scheiterte an der *N*-nucleophilen Ringöffnung von Cycloocten-Epoxiden mit den primären Aminen Benzylamin, *n*-Butylamin oder NaN_3 trotz vielfältiger Variation der Parameter (protisch/aprotische Lösungsmittel, mit/ohne Lewissäure-Zusatz)^[167]. Pastó zeigte, dass die Reaktion auch mit Epoxid-Alkoholen wie Phenylglycidol oder den korrespondierenden Ethern wie Phenylglycidylmethylether und NH_4OH mit bis zu 95 % Ausbeute funktionieren kann^[168]. Erst bei räumlich sehr anspruchsvollen Ethern (z.B. -CPh₃) verlangsamte sich die Reaktion und die Ausbeuten sanken.

Neben Stickstoff kann auch Schwefel als Nucleophil dienen. Ein Beispiel für eine *S*-nucleophile Ringöffnung von Epoxiden beschrieb Vougioukas^[169]. Er setzte verschiedene aromatische Thiole und Lanthanid-Komplexe zur Katalyse der Oxiranöffnung von Cyclohexanepoxiden ein. Auch zur Analytik von Epoxidverbindungen in Bedarfsgegenständen bedient man sich der Methode der *S*-nucleophilen Oxiranöffnung^[170]. Durch Derivatisierung mit Cysteamin erhält man Aminoverbindungen, welche anschließend mittels Kationenaustauscher aus der Matrix abgetrennt werden können. Durch RP-HPLC Messungen vor und nach Abtrennung der geöffneten Epoxide erfolgt deren Identifizierung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nucleophile Ringöffnungen mit verschiedenen Aminen (Ammoniak, Diethylamin, Benzylamin, Dibenzylamin, Natriumazid) sowie dem *S*-Nucleophil Cysteamin durchgeführt (Kapitel 4.5 und 6.7.2).

4.5 Ringöffnung der Modelloxirane mit verschiedenen Nucleophilen

4.5.1 Stickstoff-Nucleophile

Die entstandenen Epoxide **5** und **6** sollten in einem nachfolgenden Reaktionsschritt durch verschiedene Amine nucleophil geöffnet werden, um so zu den entsprechenden 3-Amino-2-hydroxypropyl-Derivaten zu gelangen (siehe Abb. 4-12). Hierzu wurden verschiedene *N*-Nucleophile eingesetzt. Bei primären Aminen ist das Auftreten von Vernetzungsreaktionen wahrscheinlich, welche aufgrund der höheren Nucleophilie der zunächst entstandenen β -Hydroxyaminoalkyl-Derivate zu erklären ist^[161]. Um dieses zu vermeiden, sollten ein großer Überschuss des Amins oder aber sterisch anspruchsvolle sekundäre Amine zum Einsatz kommen. In Hinblick auf die angestrebte Einführung endständiger primärer Aminogruppen sind Ammoniak oder nachfolgend entschützbare Amine wie Benzylamin, Dibenzylamin oder Natriumazid geeignet. Zunächst wurde jedoch Diethylamin als sterisch nicht zu anspruchsvolles und reaktionsfreudiges Amin als Modellamin für die *N*-nucleophile Ringöffnung von **5** eingesetzt.

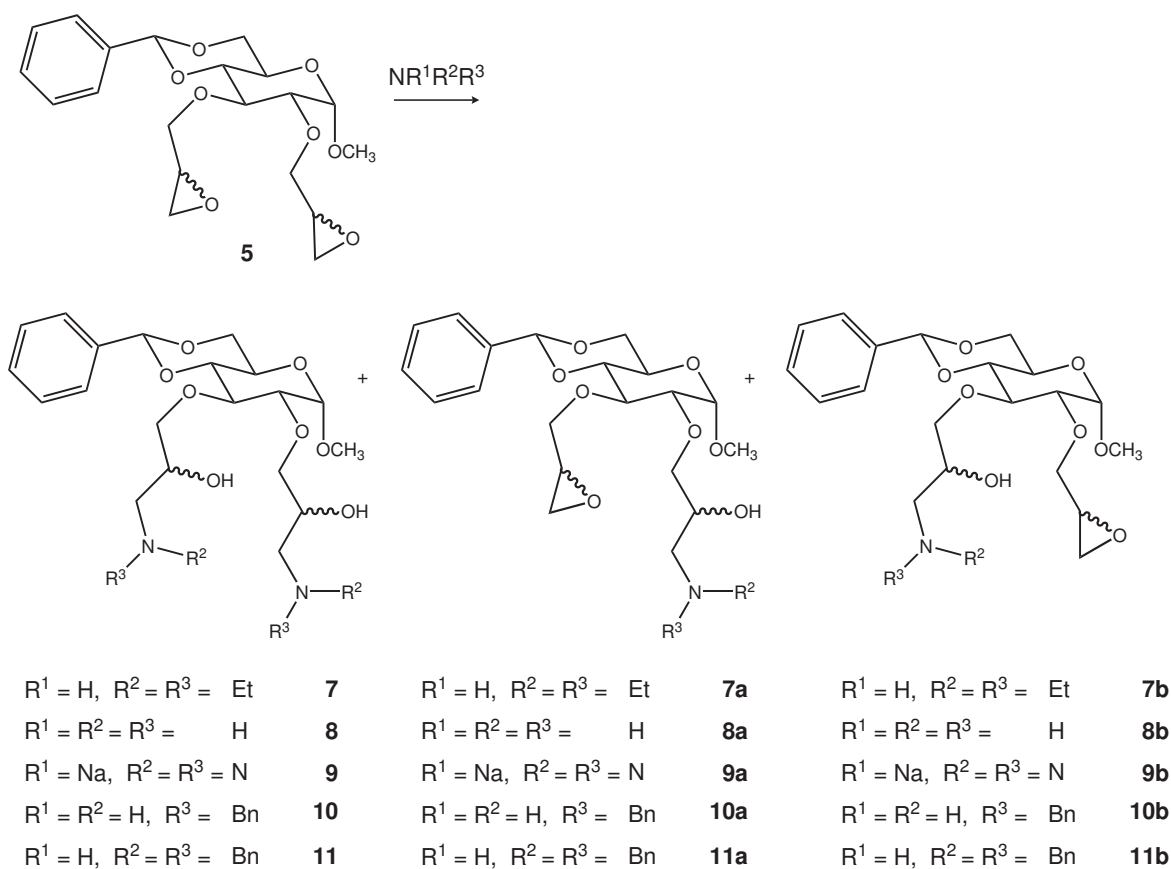


Abb. 4-12 Produkte der *N*-nucleophilen Ringöffnung von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) mit verschiedenen Aminen bzw. Na-Azid.

Die Reaktionen wurden in den meisten Fällen in einem Maßstab von 50 mg (0,13 mmol) **5** durchgeführt. Von den Produkten wurden jeweils ESI-MS Messungen angefertigt (Massenzahlen siehe Tab. 4-4) sowie von ausgewählten Produkten NMR-Spektren aufgenommen, welche in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert werden.

Tab. 4-4 Massenzahlen der Produkte der *N*-nucleophilen Ringöffnung von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**). **7-11**: 2,3-Di-(aminohydroxy)-Derivate, **a**: Mono-epoxy-mono-(aminohydroxy)-Produkte. Strukturen siehe Abb. 4-12.

Edukt	Amin	Produkte	M g/mol	[M+H]⁺ <i>m/z</i>	[M+Na]⁺ <i>m/z</i>
5			394	395	417
	Et ₂ NH	7	540	541	563
	Et ₂ NH	7a/7b	467	468	490
	NH ₃	8	428	429	451
	NH ₃	8a/8b	411	412	434
	NaN ₃	9	480	481	503
	NaN ₃	9a/9b	437	438	460
	BnNH ₂	10	608	609	631
	BnNH ₂	10a/10b	501	502	524
	Bn ₂ NH	11	788	789	811
	Bn ₂ NH	11a/11b	591	592	614

Diethylamin

Das sterisch relativ wenig anspruchsvolle sekundäre Amin Diethylamin wurde zu Modelluntersuchungen für die nucleophile Ringöffnung der Epoxygruppen von **5** eingesetzt^[165]. In einem typischen Ansatz wurde **5** in trockenem Acetonitril gelöst, mit LiClO₄ und Et₂NH versetzt und 29 Stunden bei RT oder 55 °C gerührt (siehe Tab. 4-5). Das Reaktionsgemisch wurde mit Diethylether extrahiert, gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Die Massenzahlen *m/z* = 541 und 563 ([M+H]⁺ und [M+Na]⁺) in der ESI-Massenspektrometrie zeigen, dass Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(*N,N*-3-diethyl-amino-2-hydroxypropyl)- α -D-glcp (**7**) (siehe Abb. 4-12) entstanden ist. Einfache Amino-hydroxyalkylderivate **7a/7b** wurden im ESI-MS nicht beobachtet.

Das zugehörige ¹H-NMR-Spektrum von **7** ist in Abb. 4-13 gezeigt. Im Vergleich zum Edukt **5** (siehe Abb. 4-9) wurden neue Signale von CH₃- (0,83-0,98 ppm, 12 H, H-20a-c,

22a-c, 28a-c, 30a-c) und CH₂-Gruppen (2,23-2,58 ppm, 12 H, H-18a/b, 19a/b, 21a/b, 26a/b, 27a/b, 29a/b) der Aminohydroxyalkylether detektiert. Die Resonanzen der Epoxyether bei 3,2 ppm und 2,60-2,86 ppm (vgl. Abb. 4-9) sind dagegen nicht mehr vorhanden. ¹³C-NMR-Messungen bestätigten die Identität von **7** (siehe 11.3.7.1). Jedoch traten einige Resonanzen gehäuft auf (z.B. 12,2 ppm, 6 C, CH₃, C-20, 22, 28, 30). Dieses ist auf das Vorliegen mehrerer Diastereomere zurückzuführen. Die Temperatur und die LiClO₄-Konzentration hatten keinen nennenswerten Einfluss auf die Reaktionen (siehe Tab. 4-5), deren Umsätze jeweils bei etwa 70 % lagen.

Tab. 4-5 *N*-nucleophile Ringöffnungen von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) mit Diethylamin.

Nr.	Amin	Äq./ Epoxy.	Zusätze, Lösungsmittel	T [°C]	t [h]
AV 67	Et ₂ NH	5	CH ₃ CN, LiClO ₄ (2 M)	55	29
AV 68	Et ₂ NH	5	CH ₃ CN, LiClO ₄ (0,5 M)	RT	29

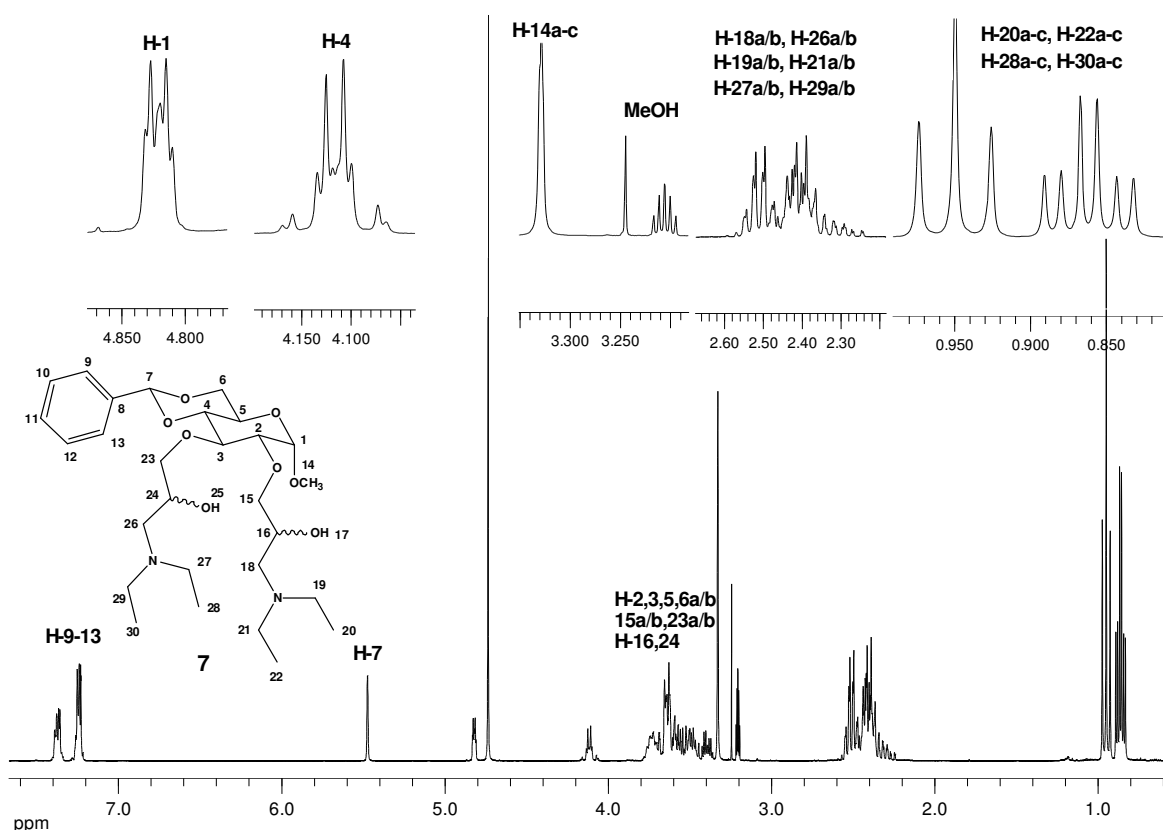


Abb. 4-13 ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, MeOH-*d*₄) von **7** (AV 68).

Die Ringöffnung von **5** mit dem *N*-Nucleophil Diethylamin verlief erfolgreich. Um zu primären terminalen Aminen (Aminopropyl-Substituenten) zu gelangen, wurden im Folgenden Ammoniak oder entschützbare Amine wie Benzylamin, Dibenzylamin und Azid eingesetzt.

Ammoniak / Ammoniumhydroxid

Bei der nucleophilen Ringöffnung mit Ammoniak erhält man direkt die primären 3-Amino-2-hydroxypropylgruppen. Allerdings ist Ammoniak ein vergleichsweise schwaches Nucleophil und muss entsprechend aktiviert werden. Dieses kann u. a. durch verschiedene katalysierende Metall-Salze wie Li- oder Mg-Perchlorat^[164] oder in Gegenwart von Ammoniumsalzen wie NH₄Cl oder NH₄F^[162] erreicht werden. Durchgeführte Versuche sind Tab. 4-6 zu entnehmen.

Tab. 4-6 *N*-nucleophile Ringöffnungen von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) mit Ammoniak bzw. Ammoniumhydroxid.

Nr.	Amin	Äq./ Epoxy.	Zusätze, Lösungsmittel	T [°C]	t [h]
TS 7	NH ₄ OH _(aq) (32 %)	33	NH ₄ Cl, 2-PrOH	80	96
AV 69	NH ₄ OH _(aq) (32 %)	40	2-PrOH	85	25
AV 80	NH _{3(g)}		LiClO ₄ , CHCl ₃	0 RT	1 96
AV 81	NH _{3(g)} <i>in situ</i>		Ca(OH) ₂ , NH ₄ Cl, CHCl ₃	-7 RT	2 380

Zum einen wurde Ammoniumhydroxid im Überschuss als Reaktionsmedium („Lösungsmittel“ bzw. Suspensionsmittel) angeboten. Zum anderen wurde versucht, in Isopropanol unter Zugabe von Ammoniumhydroxid eine nucleophile Ringöffnung zu erreichen^[168]. ESI-MS-Messungen der mit Diethylether extrahierten Reaktionsmischungen zeigten ein starkes Signal bei $m/z = 412$ sowie ein schwächeres bei $m/z = 434$, wobei es sich um H- und Na- Addukte der einfachen Additionsprodukte (**8a**, **8b**, Abb. 4-12) handelt (vgl. Tab. 4-4). ESI-MS² Messungen von $m/z = 412$ zeigten Abspaltungen von Methanol

(-32) und Benzaldehyd (-106), was die Identität bestätigte. Signale des zweifachen Additionsproduktes des geschützten Methylglucosids **8** (siehe Abb. 4-12) konnten nicht detektiert werden. Wahrscheinlich hat eine intramolekulare Reaktion zwischen der ersten eingeführten Aminogruppe und dem verbliebenen Oxiran stattgefunden (siehe Abb. 4-17, A). Diese Produkte sind massengleich den einfachen Additionsprodukten **8a/b**, jedoch für eine zweite Addition von Ammoniak nicht mehr zugänglich. Dimere, welche durch eine intermolekulare Ringöffnung (Abb. 4-17, B) entstehen könnten, wurden im ESI-MS jedoch nicht beobachtet.

Problematisch bei den in wässrigem Ammoniak geführten Reaktionen ist neben der unzureichenden Reaktivität des NH_3 die Unlöslichkeit des Eduktes **5** in wässriger Lösung. So wurde stets eine Suspension erhalten, bei welcher der Kontakt zwischen Methylglucosid und Ammoniak offenbar nicht ausreicht. Um die wässrigen Ammoniaklösungen zu umgehen, wurde aus einer NH_4OH -Lösung oder einer Vorlage aus $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und NH_4Cl Ammoniakgas in eine eisgekühlte Chloroformvorlage übergetrieben. Zu dieser Lösung wurde das ebenfalls in CHCl_3 gelöste Edukt **5** sowie LiClO_4 zugesetzt. In den organischen Phasen konnte jedoch nur das Ausgangsprodukt **5** detektiert werden. Alle Nachweisreaktionen auf Aminofunktionalitäten (Dragendorff- oder Ninhydrin-Reagenz) verliefen ebenfalls negativ.

Das vermeintlich einfachste Amin NH_3 führte somit nicht zu einer erfolgreichen nucleophilen Oxiranöffnung.

Natriumazid

Für die *N*-nucleophile Ringöffnung mit NaN_3 wurde **5** in Acetonitril, Methanol oder Methanol/Wasser gelöst bzw. suspendiert und mit LiClO_4 bzw. NH_4Cl versetzt (Tab. 4-7). Anschließend wurde NaN_3 zugegeben und die Reaktionsmischung gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Produkt mit Diethylether extrahiert.

Im ESI-MS konnten neben dem Edukt **5** auch das Protonen- und das Natriumaddukt des Methyl-2,3-di-*O*-(3-azido-2-hydroxypropyl)-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosids (**9**) (siehe Abb. 4-12) detektiert werden (Tab. 4-4). Zudem traten Signale auf, die zu den Massenzahlen von Mono-*O*-(3-azido-2-hydroxypropyl)-mono-*O*-(2,3-di-hydroxypropyl)--Nebenprodukten ($m/z = 478$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 462 $[\text{M}+\text{Li}]^+$) passen (siehe Abb. 4-14). Diese zeigen im ESI-MS² eine Abspaltung von N_2 (-14). Auch bei der Fragmentierung von **9** tritt

neben Methanol- (-32) und Benzaldehyd- (-106) eine N_2 - (-14) sowie N_3 - CH_2 - $HC=O$ - Abspaltung (-85) auf. Nach einem Tag Reaktionszeit (vgl. Tab. 4-7, TS 3) ist noch viel Edukt **5** und nur wenig Produkt **9** sowie einfache Additionsprodukte (**9a** bzw. **9b**, siehe Abb. 4-12) vorhanden. Bereits nach zwei wie auch nach drei Tagen Reaktionszeit (Tab. 4-7, TS 6-1, TS 6-2) liegt kein Edukt sondern hauptsächlich **9** vor. Mit geringerer Intensität wurden die erwähnten Monoazidohydroxypropyl-dihydroxypropyl-Nebenprodukte detektiert. Einfach geöffnete Produkte **9a** bzw. **9b** wurden hier interessanterweise nicht beobachtet, was vermutlich auf die Instabilität der nicht umgesetzten Epoxygruppen unter den Reaktionsbedingungen (80 °C) zurückzuführen ist.

Tab. 4-7 *N*-nucleophile Ringöffnungen von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) mit Natriumazid. * = Gemisch, nicht isoliert, Massenprozent bezogen auf Masse Edukt

Nr.	Amin	Äq./ Epox.	Zusätze, Lösungsmittel	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]
TS 3	NaN ₃	5	LiClO ₄ , CH ₃ CN	80	24	Edukt, 54*
TS 6-1	NaN ₃	5	LiClO ₄ , CH ₃ CN	80	48	56*
TS 6-2	NaN ₃	5	LiClO ₄ , CH ₃ CN	80	72	56*
TS 13-1	NaN ₃	8	LiClO ₄ , MeOH	RT	72	82*
TS 13-2	NaN ₃	5	NH ₄ Cl, MeOH, Wasser (8/1, v/v)	80	24	79*

Der Salzzusatz sowie das verwendete Lösungsmittel scheinen wenig Einfluss auf den Reaktionsverlauf zu nehmen. Die Erhöhung der NaN₃-Äquivalente von fünf auf acht sowie eine Absenkung der Temperatur von 80 °C auf RT erbrachte nach drei Tagen Reaktionszeit in Methanol/LiClO₄ einen deutlich erhöhten Umsatz zu **9** (Tab. 4-7, TS 13-1). Störende Nebenprodukte wurden hier im Gegensatz zur Reaktion mit 5 Äquivalenten bei 80 °C für einen Tag (Tab. 4-7, TS 13-2) im ESI-MS nicht beobachtet. Ursache ist die höhere Selektivität der Reaktion bei geringerer Temperatur sowie die unter diesen Bedingungen unterbleibende Stickstoffabspaltung. Dieses sind daher die Bedingungen der Wahl für die *N*-nucleophile Ringöffnung mit NaN₃.

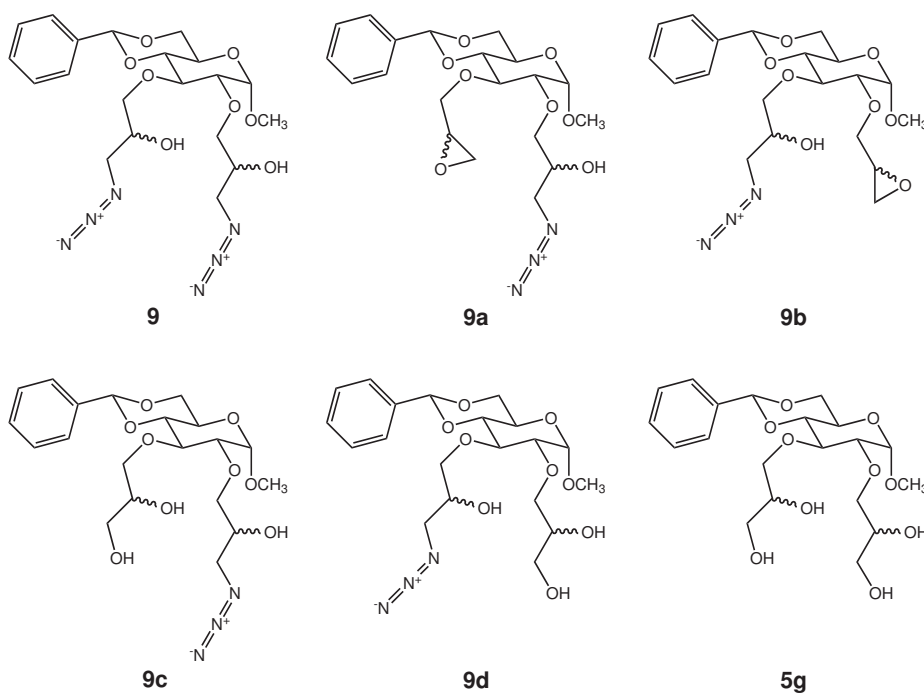


Abb. 4-14 Produkte und Nebenprodukte bei der *N*-nucleophilen Ringöffnung von **5** mit NaN_3 .

Eine nachfolgende Reduktion der Azide zum primären Amin z.B. mit Raney Nickel^[171], LiAlH_4 ^[46,47], NaBH_4 ^[47] oder PPh_3 ^[47,48] ist prinzipiell möglich, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

Benzylamin

In einem typischen Versuchsansatz wurde **5** in Acetonitril gelöst und anschließend mit Benzylamin versetzt und gerührt^[172]. Das Produkt wurde mit Diethylether extrahiert (siehe Tab. 4-8).

Tab. 4-8 *N*-nucleophile Ringöffnungen von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) mit Benzylamin. * = Gemisch, nicht isoliert, Massenprozent bezogen auf Masse Edukt

Nr.	Amin	Äq./ Epox.	Zusätze, Lösungsmittel	T [°C]	t [h]	Umsatz [%]
TS 2	BnNH_2	2	CH_3CN	RT	24	84*
TS 5-1	BnNH_2	2	CH_3CN	50	24	69*
TS 5-2	BnNH_2	2	CH_3CN	80	24	89*
TS 12	BnNH_2	4	CH_3CN	80	24	53*

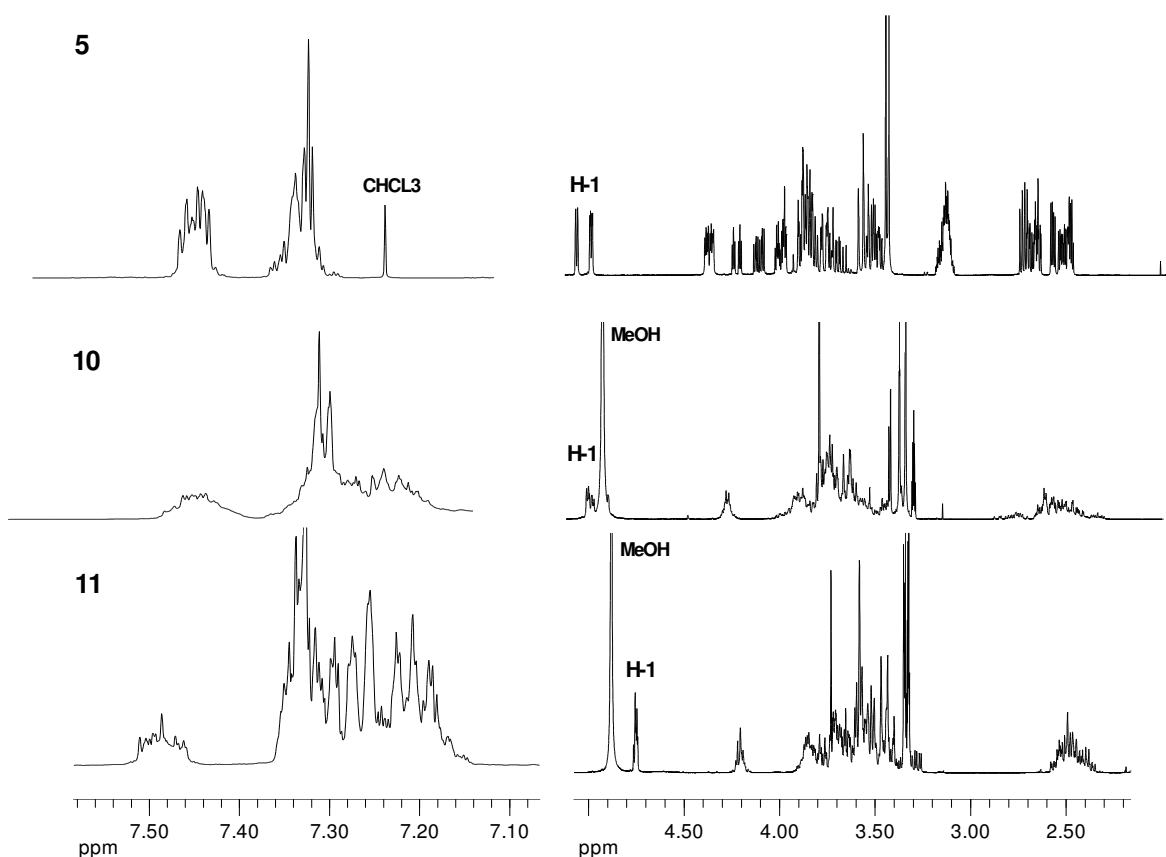


Abb. 4-15 Vergleich der Ausschnitte 7,1-7,6 ppm und 2,2-5,0 ppm der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) des isolierten Epoxy-Derivates **5** (CDCl_3 , siehe auch Abb. 4-9), des Benzylamin-Derivates **10** (Rohprodukt, $\text{MeOH-}d_4$) und des isolierten Dibenzylamin-Derivates **11** ($\text{MeOH-}d_4$, siehe auch Abb. 4-19).

Im ESI-MS wurden mit geringer Intensität (10^4) Monoadditionsprodukte (**10a/10b**, siehe Abb. 4-12) sowie mit hoher Intensität (10^7) das gewünschte Zielprodukt **10** detektiert (Tab. 4-4). Sowohl ^1H -NMR- (siehe Abb. 4-15) als auch ^{13}C -NMR-Messungen (siehe Abschnitt 11.3.7.4) konnten durch die Anwesenheit neuer aromatischer Signale und das Verschwinden von Signalen der Epoxygruppen diesen Befund unterstützen. Bei den erhaltenen Produkten handelt es sich um Stereoisomerengemische (*R,R/R,S/S,R/S,S*). Jedes dieser Diastereomere besitzt mehrere diastereotop CH_2 -Gruppen, so dass die Resonanzen im NMR sehr komplex werden und nicht mehr aufgelöst werden können.

Als Nebenprodukte wurden in den ESI-Massenspektren der Ansätze mit zwei Äquivalenten Benzylamin (siehe Tab. 4-8, TS 2, 5-1 und 5-2) Signale von Dimeren ($m/z = 1110,8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $1132,7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, Intensität je 10^5) beobachtet, welche vermutlich durch intermolekulare Addition eines Aminoderivates (**10**) und eines Epoxypropyl-

Derivates (**10a/10b**) entstanden sind (vgl. Abb. 4-17, B). Auch Dimere, die nur zwei bzw. eine Benzylamino-Gruppe tragen ($m/z = 896,5 [M+H]^+$, $1003,6 [M+H]^+$, $1025,6 [M+Na]^+$) wurden bei einer Reaktionstemperatur von 80 °C (Tab. 4-8, TS 5-2) beobachtet. Diese Dimere können aus der intermolekularen Addition von **5** und **10**, von **5** und **10a/b**, oder von zwei Molekülen **10a/b** entstehen (siehe Abb. 4-16). Hier könnte es sich auch um Clusterbildung (Artefakte) der ESI-MS-Messung handeln. Dieses könnte durch stärkere Verdünnung der Messlösung überprüft werden, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Auch bei dünnschichtchromatographischer Analytik der Produkte aus Ansatz TS 5-2 (Tab. 4-8) zeigten sich dessen ungeachtet Substanzen, welche nicht mobilisiert werden konnten ($R_f = 0$), was ebenfalls auf die Anwesenheit von oligomeren Verbindungen hindeutet.

Das Auftreten intermolekularer Reaktionen beim Einsatz primärer Amine legt den Verdacht nahe, dass auch eine intramolekulare Reaktion zwischen Epoxid und Aminohydroxypropyl-Gruppe erfolgt sein könnte. Dieses Produkt hätte denselben m/z -Wert wie **10a** und **10b**, könnte aufgrund der fehlenden Oxiran-Funktionalität jedoch nicht mehr weiter zum Diamino-Produkt **10** reagieren (vgl. Abb. 4-17, A). ESI-MS² Messungen von $m/z = 502$ konnten aufgrund unspezifischer Fragmentierung diesen Verdacht weder erhärten noch widerlegen.

Um eine Vernetzung von vornherein auszuschließen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit Dibenzylamin als *N*-Nucleophil eingesetzt.

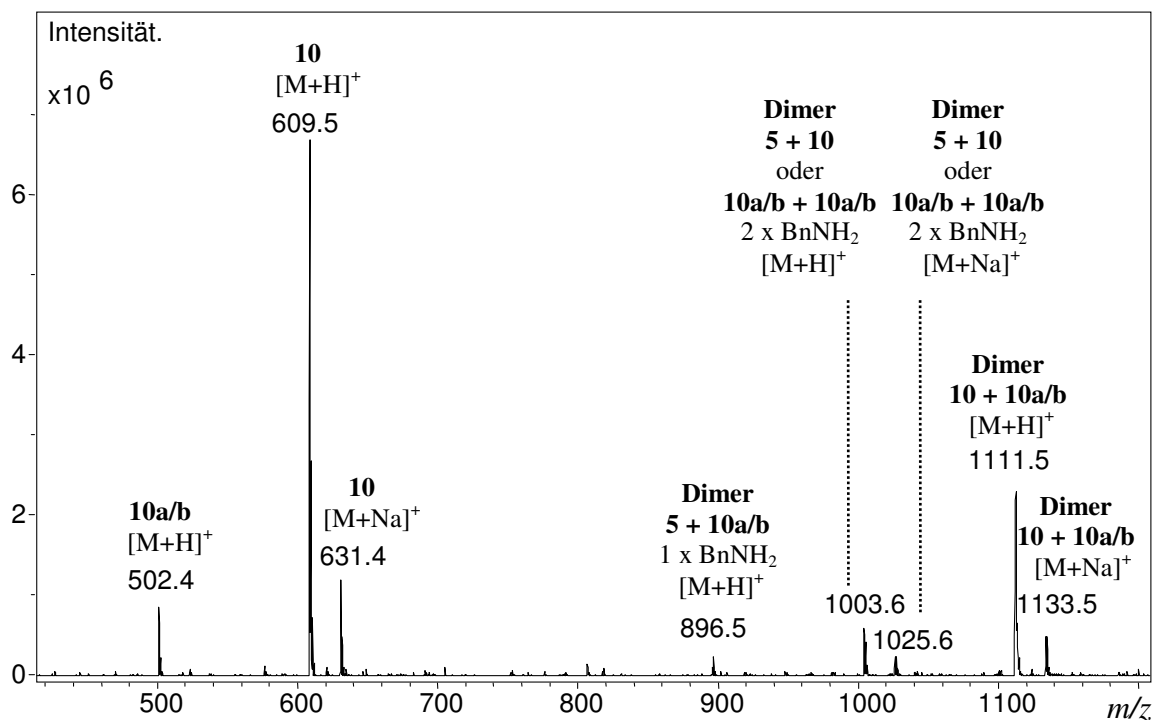


Abb. 4-16 ESI-Massenspektrum von mit Benzylamin geöffnetem **5**. Neben den geöffneten Produkten **10** und **10a** sind Produkte aus verschiedenen intermolekularen Reaktionen erkennbar (Dimer).

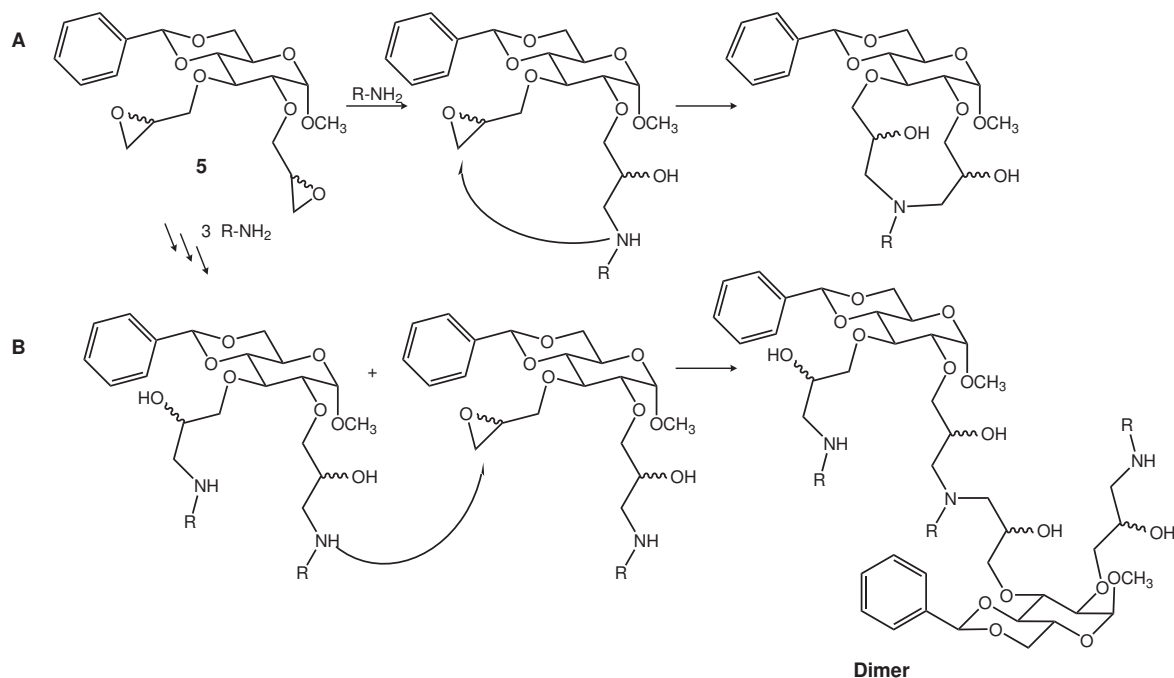


Abb. 4-17 Mögliche Verknüpfungen bei der N-nucleophilen Ringöffnung von **5** mit primären Aminen. **A**: Beispiel für eine intramolekulare Addition, **B**: Beispiel für eine intermolekulare Addition.

Dibenzylamin

Die analoge Umsetzung von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) mit dem reaktiveren aber sterisch anspruchsvolleren Dibenzylamin^[173] erfolgte wie für Benzylamin beschrieben. Das mit Diethylether extrahierte Produktgemisch wurde mittels Säulenchromatographie aufgetrennt.

Tab. 4-9 *N*-nucleophile Ringöffnungen von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) mit Dibenzylamin. Ausbeute an **11** nach säulenchromatographischer Isolierung.

Nr.	Äq./ Epox.	Lösungsmittel, Zusätze	T [°C]	t [h]	Ausbeute 11 [%]
TS 14-1	4	CH ₃ CN	60	48	47
TS 14-2	4	CH ₃ CN	80	48	9
AV 75	1	CH ₃ CN, LiClO ₄ (1 Äq./Epox)	60	48	n.b.
AV 76	2	CH ₃ CN, LiClO ₄ (1 Äq./Epox)	60	48	n.b.
AV 77	10	CH ₃ CN, LiClO ₄ (1 Äq./Epox)	60	48	48

n.b. = Ausbeute nicht bestimmt.

Die Äquivalente Dibenzylamin je Epoxygruppe wurde variiert (Tab. 4-9). Bereits bei einem Äq./Epoxid traten wie erwartet keine Dimere, sondern einzig das Di-(3-dibenzylamino-2-hydroxypropyl)-derivat **11** ($[M+H]^+$ m/z = 789, $[M+Na]^+$ m/z = 811, $[M+K]^+$ m/z = 827, Tab. 4-4) auf. Weder einfach geöffnete Produkte **11a** bzw. **11b** noch verbliebenes Edukt **5** wurden im ESI-Massenspektrum beobachtet (vgl. Abb. 4-18).. Letzteres wird jedoch aufgrund der sehr guten Detektion der Amine im ESI-MS stark diskriminiert. Die Erhöhung auf zwei bzw. zehn Äquivalente hatte keinen nennenswerten Einfluss auf den Reaktionsverlauf. Der Zusatz von Lithiumperchlorat und die Verwendung von 10 Äquivalenten Dibenzylamin brachten eine leichte Erhöhung der Reaktionsausbeute auf 48 % (vgl. Tab. 4-9).

Im ¹H-NMR-Spektrum treten aromatische Signale mit größerer Intensität sowie Signale der Methylengruppen der Benzylaminoderivate bei 2,5 ppm und 3,6 ppm auf (siehe Abb. 4-19). Gleichzeitig verschwinden die Resonanzen der Epoxygruppen, was für eine

erfolgreiche Ringöffnung und kovalente Bindung des Dibenzylamins spricht. Auch im ^{13}C -NMR/DEPT-Spektrum finden sich entsprechende Signale der fünf quartären, der neuen aromatischen sowie der neuen Methylen-C-Atome.

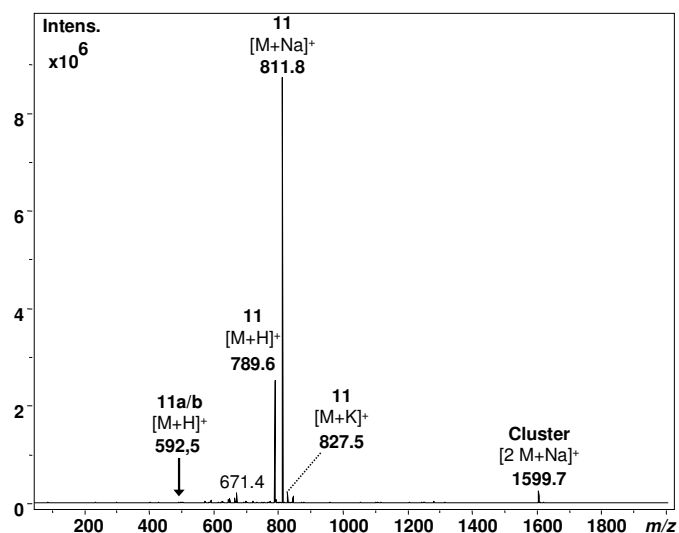


Abb. 4-18 ESI-Massenspektrum des Rohproduktes der *N*-nucleophilen Ringöffnung von **5** mit Dibenzylamin (1 Äq./Epoxygruppe, AV 75).

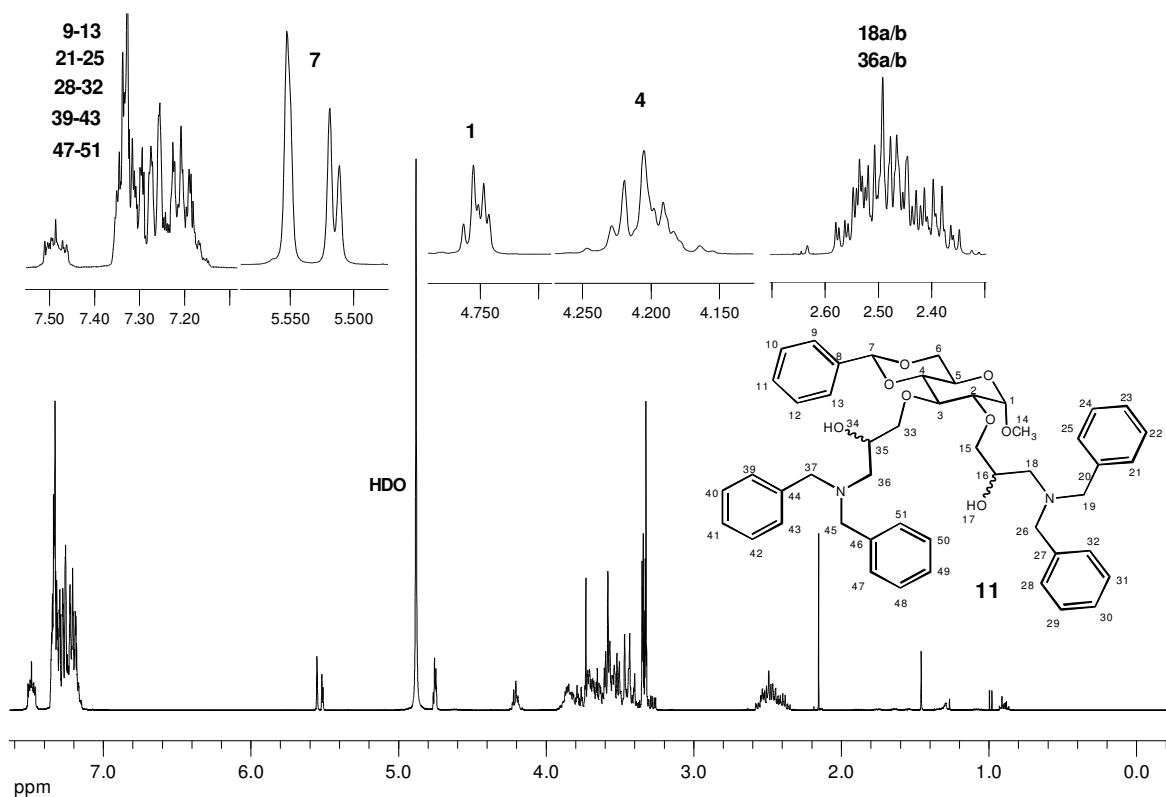


Abb. 4-19 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) der säulenchromatographisch isolierten diastereomeren Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxypropyl)- α -D-glucopyranoside (**11**).

Die nucleophile Ringöffnung mit Dibenzylamin ist folglich eine geeignete Reaktion, um zum gewünschten 2,3-Di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxypropyl)-Derivat **11** zu gelangen. Es treten keine Vernetzungen auf und das Zielmolekül **11** wurde als Hauptprodukt erhalten.

Entschüttung der Benzylamine

Die Entschüttung der Benzylamine zu den primären Aminen lässt sich durch katalytische Hydrierung verwirklichen (Abb. 4-20). Bei den Benzyliden-geschützten Methylglucosiden (**10**, **11**) ist jedoch zu beachten, dass neben den Benzylgruppen auch die Benzylidenschutzgruppe abgespalten wird, infolgedessen aufgrund der erhöhten Polarität der erhaltenen Aminoalkohole keine Extraktion der Produkte mehr möglich sein dürfte.

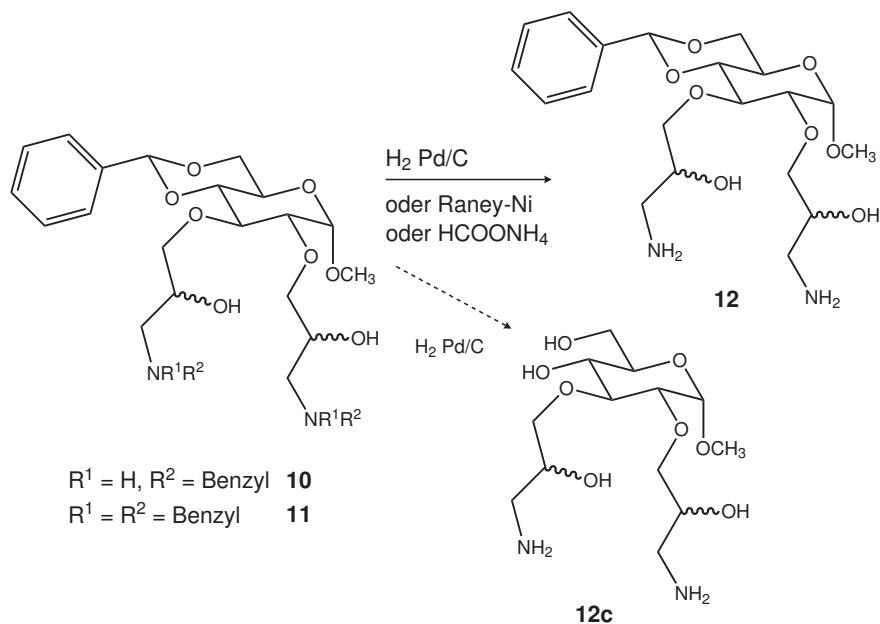


Abb. 4-20 Reduktion von Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**10**) und Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glucopyranosid (**11**) zu Methyl-2,3-di-*O*-(3-amino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**12**) und dem vollständig entschüttzten Produkt Methyl-2,3-di-*O*-(3-amino-2-hydroxy)propyl- α -D-glucopyranosid (**12c**).

Mit Ammoniumformiat als Wasserstoffdonor und Palladium/Kohlenstoff (Pd/C) als Katalysator können nach Bieg *et al.* *O*-Benzylether selektiv neben Benzylidenacetalen gespalten werden^[174]. Diese Methode wurde auf ihre Eignung zur Benzylaminentschüttung überprüft. Etwa 0,1 mmol **10** wurden in Methanol mit Pd/C (10%) und Ammoniumformiat (4,7 Äquivalente/ Benzylamin) versetzt und 4 h unter Rückfluss erhitzt (Tab. 4-10,

TS 5-2). Nach Abfiltrieren des Pd/C zeigten sich bei ESI-MS-Untersuchungen Signale, deren m/z -Werte mit H- und Na-Addukten des Methyl-*O*-(3-amino-2-hydroxy)propyl-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**12b**) (Abb. 4-21) übereinstimmt. Dieses könnte jedoch auch ein Artefakt der ESI-MS-Messung sein, welches durch NH_3 -Abspaltung aus **12** entstanden ist. Das Produkt **12** oder einfach hydriertes Produkt **12a** (siehe Abb. 4-21 und Tab. 4-11) wurden nicht detektiert.

Die Ammoniumformiat-Methode eignete sich also nicht, um das gewünschte reduzierte Amin **12** zu erhalten.

Tab. 4-10 Entschützungsversuche des Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosids (**10**) und des Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glucopyranosids (**11**) durch katalytische Hydrierung.

Edukt	PdC/ Bn-Amin [g/mmol]	H ₂ bar	Lösungsmittel, Zusätze	T °C	t [h]	Produkt
TS 2 10	0,1	30	MeOH	RT	48	Gemisch
TS 5-1 10	1) 0,1	30	MeOH	RT	1) 14	Gemisch
	2) 0,2	30	MeOH	RT	2) 48	Gemisch
TS 5-2 10	1	-	MeOH, HCOONH ₄ 4,7Äq./Bn	80	4	Gemisch
AV 76 11	0,1	30	MeOH	RT	18	

Alternativ wurde eine katalytische Hydrierung mit Wasserstoff (Pd/C, 30 bar H₂, RT, 14 h) im Autoklaven durchgeführt (Tab. 4-10, TS 2, 5-1, AV 76). Obwohl Voruntersuchungen zur Hydrierung von **2** und **3** gezeigt hatten, dass unter diesen Bedingungen auch eine Abspaltung der Benzylidengruppe erfolgt, war die Benzylidengruppe bei den mit Benzylamin substituierten Methylglucosiden **10** und **11** erstaunlicherweise stabil. Hier wurden lediglich die Benzylaminogruppen hydriert. Nach 14 h Reaktionszeit waren sowohl Edukt **10** als auch das einfach hydrierte Derivat **12a** (vgl. Abb. 4-21) neben dem vollständig *N*-entschützten **12** massenspektrometrisch nachweisbar (vgl. Abb. 4-22, oben). Nach 48 h war hingegen kein Edukt mehr nachweisbar und das Produktspektrum hatte sich in Richtung **12** verschoben (vgl. Abb. 4-22, unten).

Auch hier wurden Massenzahlen detektiert, welche mit dem H-Addukt von Methyl-*O*-(3-amino-2-hydroxy)propyl-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**12b**) übereinstimmen. Die Natrium- ($m/z = 451$) und Protonenaddukte ($m/z = 429$) von **12** wurden mittels MS²-Messungen durch CID fragmentiert. Interessanterweise eliminierte das Na-Addukt im MS² fast ausschließlich NH₃ (-17, -34), wohingegen das Protonenaddukt nur eine Abspaltung von Methanol- (-32) und Wasser- (-18) zeigt. Eine Eliminierung von Ammoniak aus dem H-Addukt von **12** bereits im Mutterspektrum, welche ebenfalls zu einem m/z -Wert von 412 führte, ist daher unwahrscheinlich. Es handelt sich bei $m/z = 412$ demnach um das hydrierte Epoxy-Derivat **12b**, welches aus **10a** resultierte.

In den zugehörigen ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren des Hydrierungsrohproduktes nahmen die Intensitäten der aromatischen Signale sowie die Signale der Benzyl-CH₂ ab, was für eine erfolgreiche *N*-Entschützung spricht.

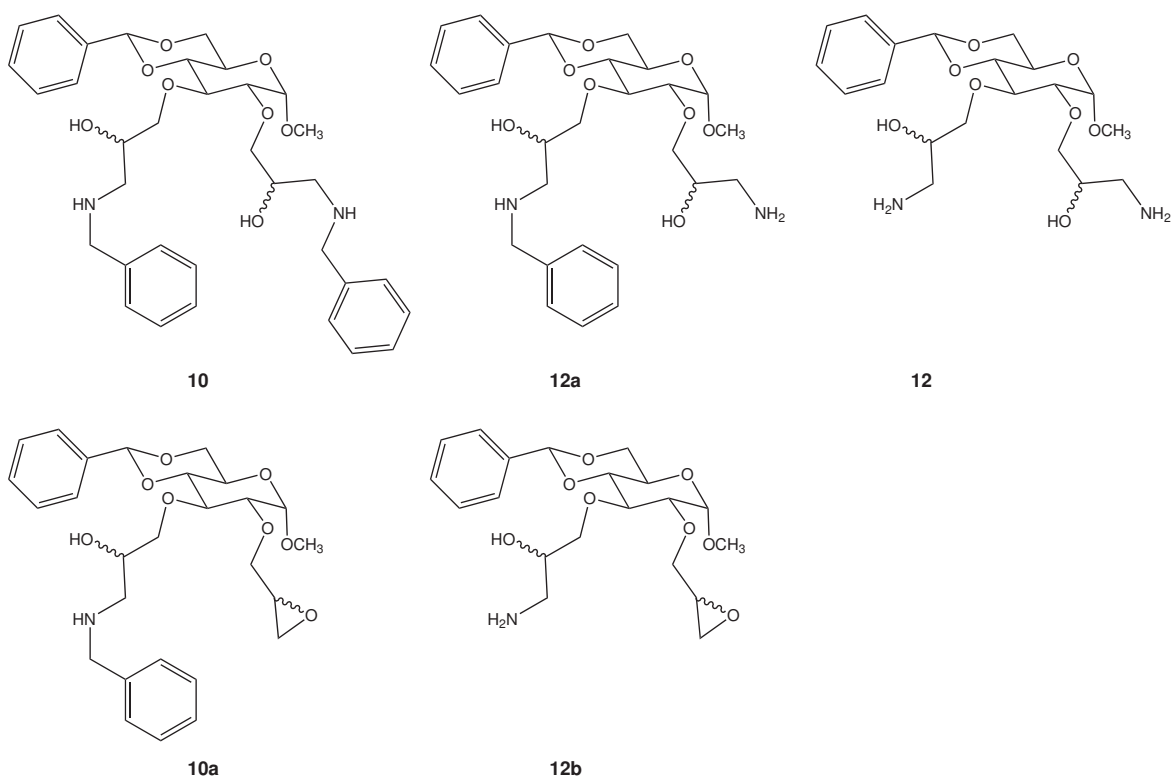


Abb. 4-21 Mögliche Hydrierungsprodukte am Beispiel von Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)-propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**10**).

4 Reaktionen an Glucose-Modellsubstanzen

Tab. 4-11 Massenzahlen der Hydrierungsprodukte von Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**10**) und von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glucopyranosid (**11**). red = reduziert.

Edukt	Amin	Produkte	M g/mol	[M+H] ⁺ m/z	[M+Na] ⁺ m/z
10	BnNH ₂		608	609	631
		12 (2 Bn red)	428	429	451
		12a (1 Bn red)	518	519	541
10a	BnNH ₂		501	502	524
		12b (1 Bn red)	411	412	434
11	Bn ₂ NH		788	789	811
		12 (4 Bn red)	428	429	451
		13a (3 Bn red)	518	519	541
		13b (2 Bn red)	608	609	631
		13c (1 Bn red)	698	699	721
11a	Bn ₂ NH		591	592	614
		13d (2 Bn red)	411	412	434
		13e (1 Bn red)	501	502	524

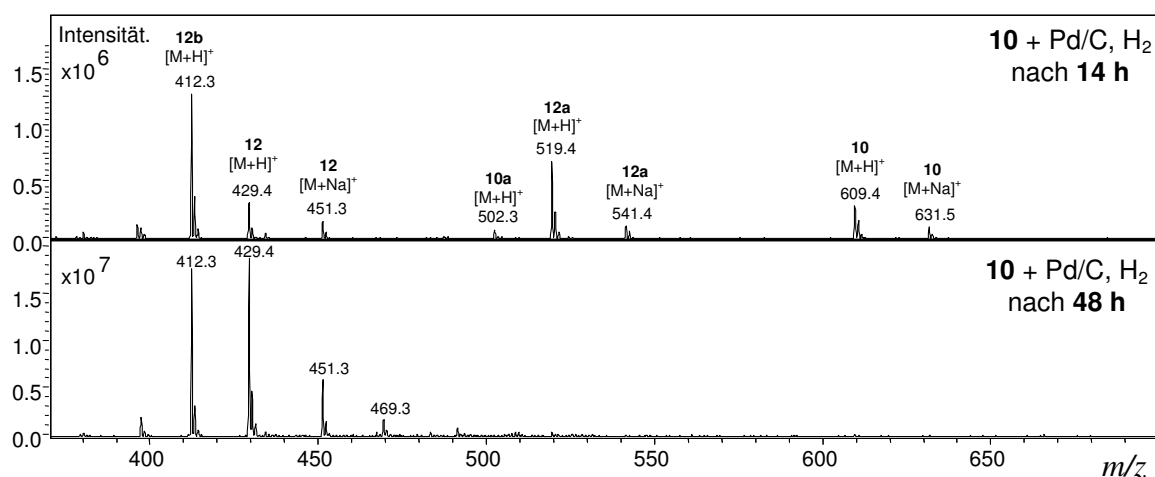


Abb. 4-22 ESI-Massenspektren des Produktgemisches der Hydrierung des Rohproduktes von Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**10**) (TS 5-1, verunreinigt mit **10a/10b**) mit PdC/H₂. Oben: nach 14 h, unten: nach 48 h.

Bei der katalytischen Hydrierung von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glcp (**11**) wurden nach 18 h Reaktionszeit dreifach- (**13a**) und vollständig reduziertes Produkt **12** erhalten (vgl. Abb. 4-24). Weitere Isomere (siehe Abb. 4-23) wurden im ESI-MS nicht beobachtet, so dass die Reduktion erfolgreich war.

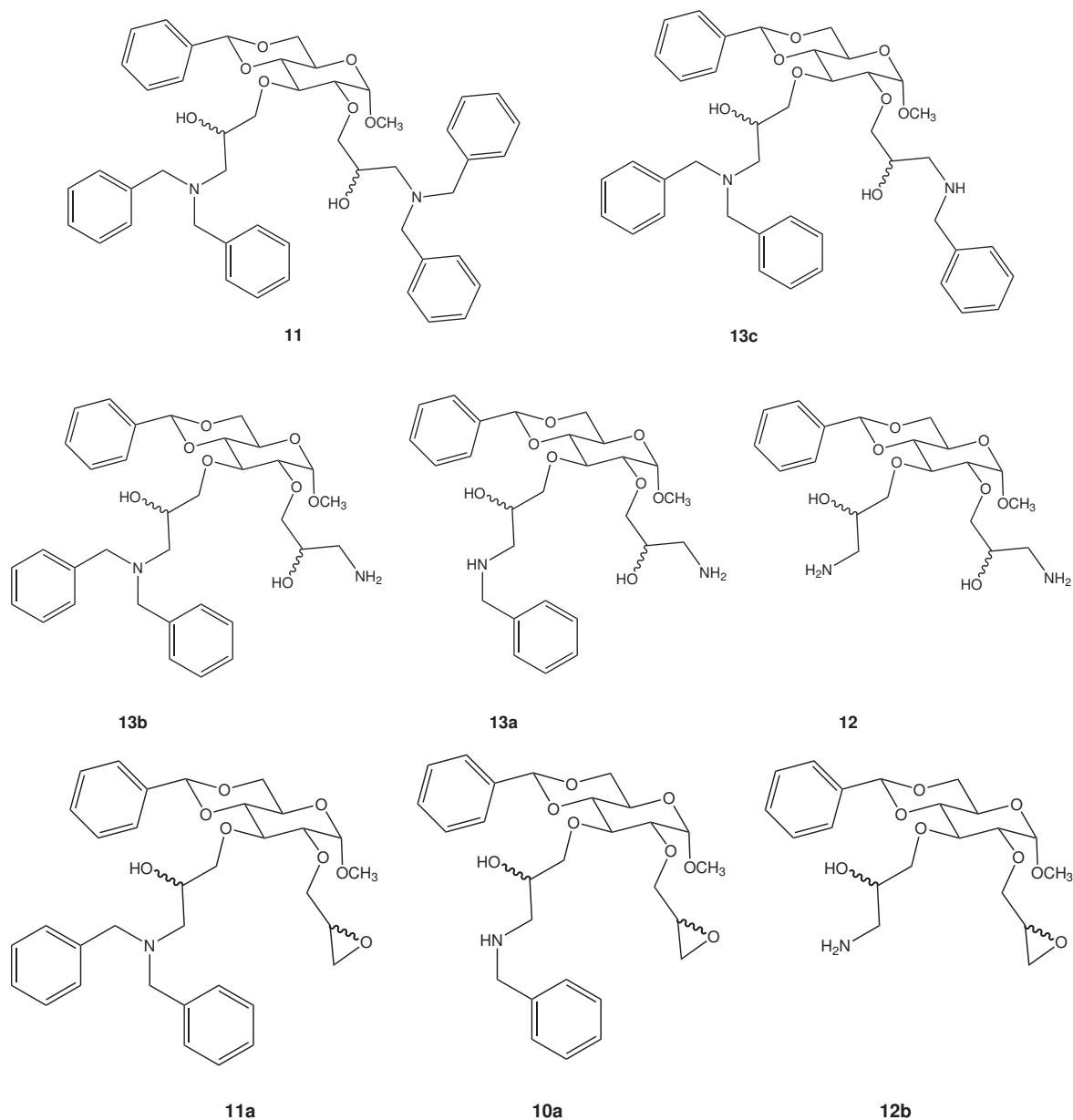


Abb. 4-23 Beispiele für Produkte der Hydrierung von **11** (oben) und des Monoepoxyderivats **11a** (unten).

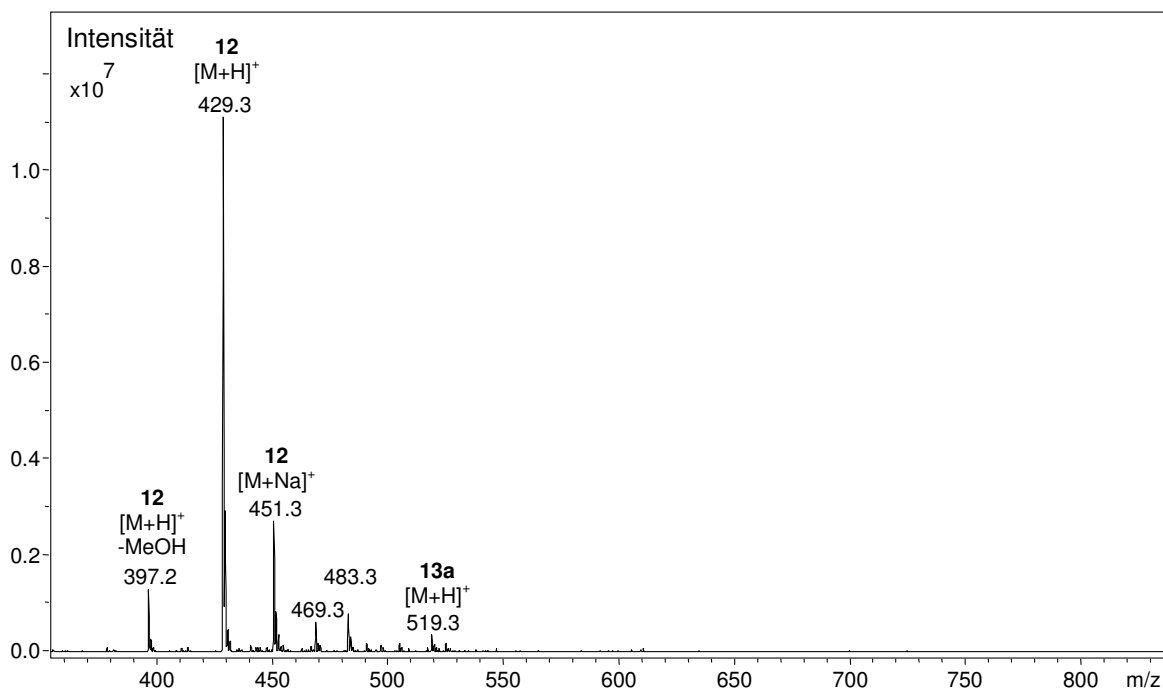
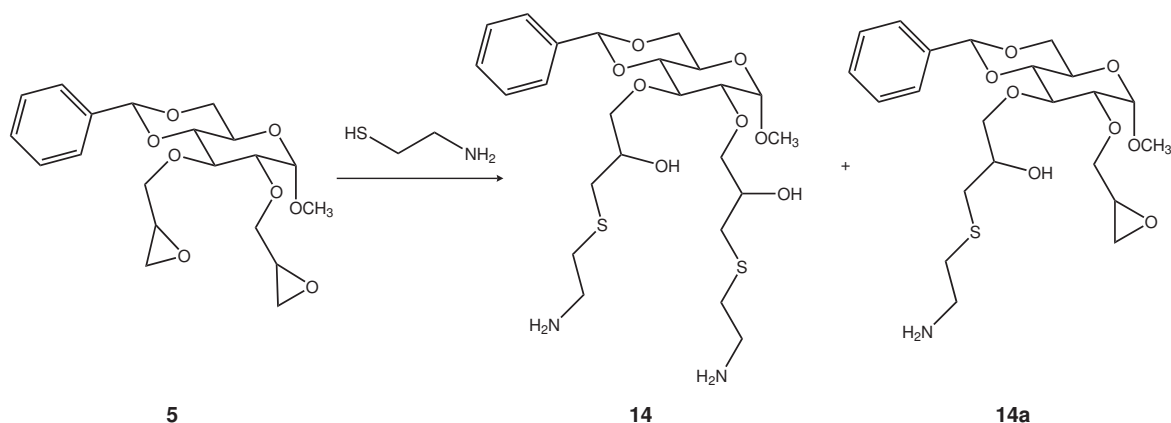


Abb. 4-24 ESI-Massenspektrum des Rohproduktes der Hydrierung von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glucopyranosid (**11**) mit PdC/H₂ nach 18h RT.

Zusammenfassend erscheint die *N*-nucleophile Ringöffnung der Epoxide mit Dibenzylamin aufgrund deren ausreichenden Reaktivität sowie der nachträglichen guten Entschützbarkeit durch Hydrierung mit H₂/PdC zu den (3-Amino-2-hydroxy)propyl-ethern als potenteste Methode, um aus den Oxiranen primäre Aminopropylether zu synthetisieren. Durch die Verwendung von Dibenzylamin sind intra- und intermolekulare Nebenreaktionen ausgeschlossen, so dass nur ein geringer Reagenzüberschuss zur vollständigen Ringöffnung der Oxirane erforderlich ist.

4.5.2 Schwefel-Nucleophile

Neben Stickstoffnucleophilen kann das Oxiran auch durch Schwefel-Nucleophile geöffnet werden (siehe 4.4). Durch die Verwendung eines Aminothiols wie Cysteamin gelangt man auf diese Weise ebenfalls zu Aminopropylethern. In einer Gruppe von Nucleophilen sinkt die Nucleophilie mit zunehmender Elektronegativität des angreifenden Atoms^[121]. Das bifunktionelle Cysteamin wird daher aufgrund der höheren Elektronegativität des Stickstoffes (3,1) im Vergleich zu Schwefel (2,3) nur mit dem nucleophileren Thiol den Epoxidring angreifen (vgl. Abb. 4-25).

Abb. 4-25 Prinzip und Produkte der S-nucleophilen Ringöffnung von **5** mit Aminoethanthiol (Cysteamin).Tab. 4-12 Reaktionsbedingungen der nucleophilen Ringöffnung von **5** mit dem S-Nucleophil Cysteamin.

Zuordnung	Äq./Epox.	Lösungsmittel	T [°C]	t [h]
AV 85	1,2	MeOH	50	44
AV 86	1,5	MeOH	60	48
AV 87	2,0	MeOH	60	48

Das Diepoxid **5** wurde in Methanol mit unterschiedlichen Äquivalenten an Cysteamin versetzt und zwei Tage bei 50-60 °C gerührt (Tab. 4-12). Nach Extraktion wurden die erhaltenen Lösungen massenspektrometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich ein Einfluss der Äquivalente: Bei Zusatz von 1,2 Äquivalenten pro Epoxid wurde das zweifach geöffnete Produkt Methyl-2,3-di-*O*-(3-(2-aminoethylthio)-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**14**) neben nur einfach geöffnetem Methyl-mono-*O*-(3-(2-aminoethylthio)-2-hydroxy)propyl-mono-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**14a**) beobachtet (siehe Abb. 4-26 und Tab. 4-13). Bei Erhöhung der Äquivalente auf 1,5 bzw. 2,0 nimmt im direkten Vergleich die relative Intensität von **14** im ESI-MS von 59 % auf 68 % zu, wobei die relative Intensität von **14a** von 19 % auf 7 % absinkt (vgl. Abb. 4-27). Eine Erhöhung der Äquivalente verbessert demnach die Ausbeute an **14**. Allerdings ist **14** unter den ESI-MS-Messbedingungen offenbar nicht absolut stabil, da bereits im Mutterspektrum Fragmente beobachtet werden, die auch bei MS² Messungen von **14**

auftreten (-MeOH, -NH₃). Diese Zerfallsprodukte liegen durchweg bei 3-6 % der relativen Intensität.

Tab. 4-13 Massenzahlen der Produkte aus der *S*-nucleophilen Ringöffnung von **5** mit Cysteamin, welches mit dem *N*-Nucleophil Cystamin verunreinigt ist.

Edukt	Nucleophil	Produkte	M	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺
			g/mol	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
5			394	395	417	433
Cysteamin			77			
Cystamin			152			
	Cysteamin	14	548	549	571	587
	Cysteamin	14a	471	472	494	510
	Cystamin	14a + Cystamin	623	624	646	662
	Cystamin	5 + 1 Cystamin	546	547	569	585
	Cystamin	5 + 2 Cystamin	698	699	721	737
	Cysteamin	14 - MeOH	494	495	517	533
	Cysteamin	14 – NH ₃	531	532	554	570

Neben der Addition von Cysteamin wurden auch Signale beobachtet, deren *m/z*-Werte für eine *N*-nucleophile Ringöffnung durch Cystamin (H₂N-C₂H₄-S-)₂ sprechen. Diese Verunreinigung des Reagenzes tritt durch Oxidation an der Luft leicht auf. Ihr Gehalt wurde mittels ¹H-NMR auf etwa 25 mol % bestimmt. In der direkten Konkurrenz unterliegt dieses *N*-Nucleophil jedoch dem Thiol Cysteamin, welches die Ringöffnung bedeutend schneller vollzieht. So wurden Cystamin-Addukte lediglich an bereits einfach durch Cysteamin geöffneten Produkten beobachtet (**14a** + Cystamin). Hingegen wurden direkt durch Cystamin einfach geöffnete Epoxide ([M+H]⁺ = *m/z* 547) nur in Spuren, zweifach durch Cystamin geöffnetes Produkt gar nicht beobachtet (vgl. Abb. 4-26). Auch die relative Intensität der Cystamin-Signale bleibt mit ca. 1 : 10 (Cystamin- : Cysteamin-Produkte) hinter dem molaren Verhältnis der Nucleophile in der Reaktionsmischung (Cystamin : Cysteamin = 1 : 3) zurück. Dieses spricht für die schnellere Kinetik der Ringöffnung durch das Thiol und bestätigt die oben aufgrund von Literaturangaben gemachte Einschätzung.

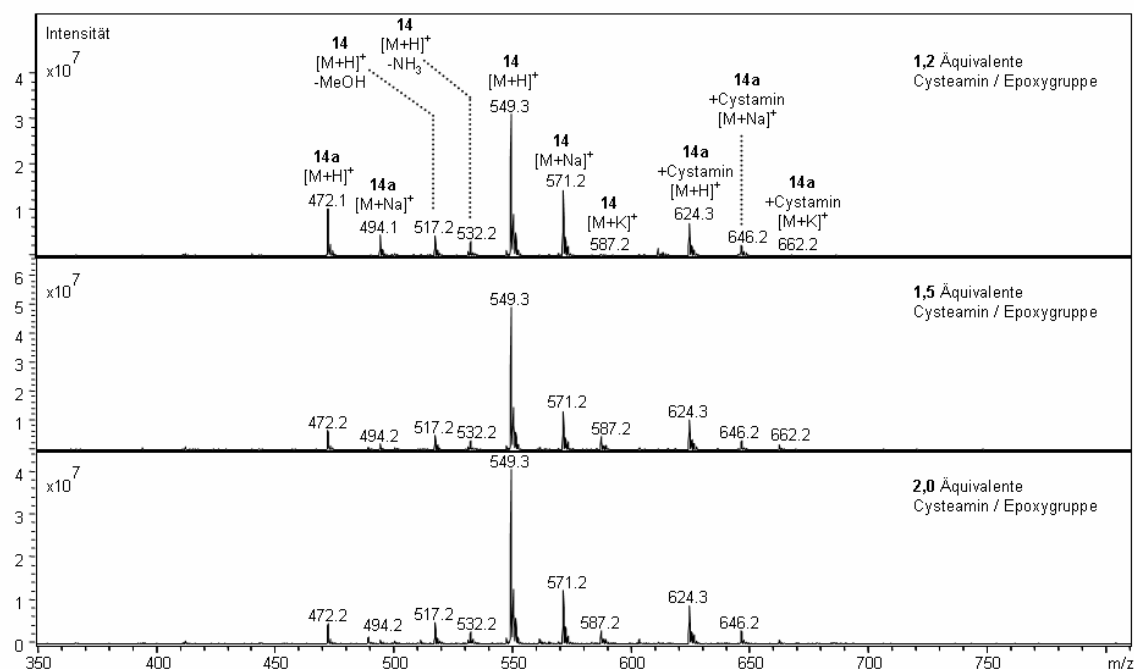


Abb. 4-26 ESI-Massenspektren der Produkte der *S*-nucleophilen Ringöffnung von **5** mit unterschiedlichen Äquivalenten an Cysteamin.

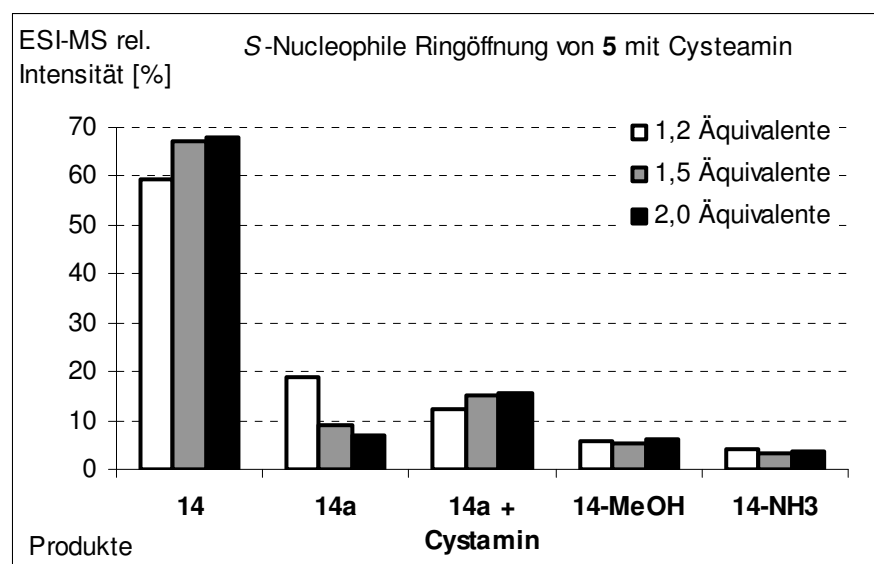


Abb. 4-27 Relative Intensitäten der Produkte der *S*-nucleophilen Ringöffnung von **5** mit Cysteamin in den ESI-Massenspektren.

Um diese Nebenreaktionen von vornherein zu vermeiden, wäre eine Vorbehandlung des Cysteamins mit einem Reduktionsmittel geeignet, um das enthaltene Cystamin wieder zu Cysteamin zu spalten.

Das im Vergleich zu Aminen reaktivere Cysteamin ermöglicht eine direkte Einführung der Aminogruppe. Die nachfolgende Entschützung, wie es bei den Benzylamin-Derivaten notwendig ist, entfällt. Nach Reinigung des Reagenzes und dessen Lagerung unter Sauerstoffausschluss sind relativ wenige Nebenprodukte zu erwarten. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die nucleophile Ringöffnung von Epoxiden durch Cysteamin auch an Alkenylpolysacchariden angewandt werden (siehe Abschnitt 6.7.2).

4.6 Hydroaminomethylierung – Stand der Forschung

Die Hydroaminomethylierung (Abb. 3-10, i) wurde durch die Entwicklung neuer, effizienter Katalysatoren basierend auf Rhodiumkomplexen zu einer leistungsstarken Methode, um aliphatische Amine aus Olefinen zu gewinnen^[139]. Bei einer Hydroaminomethylierung erfolgt zunächst eine Hydroformylierung mit Synthesegas ($\text{CO} : \text{H}_2 = 1 : 5$) des Olefins *in situ* zum Aldehyd, welches im Anschluss mit einem primären oder sekundären Amin oder NH_3 mittels H_2 katalytisch reduktiv aminiert wird^[175]. Mit dieser Kettenverlängerung um eine CH_2 -Gruppe erhält man primäre (mit NH_3), sekundäre (mit primären Aminen) oder tertiäre Amine (mit sekundären Aminen). Die einzelnen Schritte dieser Reaktion mit hoher Atomökonomie und Effizienz sind am Beispiel von Ammoniak in Abb. 4-28 dargestellt. Man erhält ein Produktgemisch aus primären *n*- und *iso*-Aminen sowie sekundären (und in Spuren tertiären) Aminen, die aus Sekundärreaktionen der zunächst gebildeten Amine resultieren. Die *n* : *iso*-Selektivität sowie das Verhältnis von primären zu sekundären Aminen lässt sich durch geschickte Wahl der Reaktionsbedingungen (NH_3 -Äquivalente, Lösungsmittel, Katalysatoren, Liganden) gut steuern.

Die Kompatibilität der Hydroaminomethylierung mit Hydroxygruppen oder Alkylethern konnten Beller *et al.* durch die Umsetzung von 3,3-(Diethoxy)prop-1-ene mit Morpholin oder 3-Aminopropan-1-ol sowie der Reaktionen von Pent-4-en-1-ol und Hex-5-en-1-ol mit Morpholin, welche mit einer *n*-Amin Ausbeute von je mind. 97 % verliefen, unter Beweis stellen^[176].

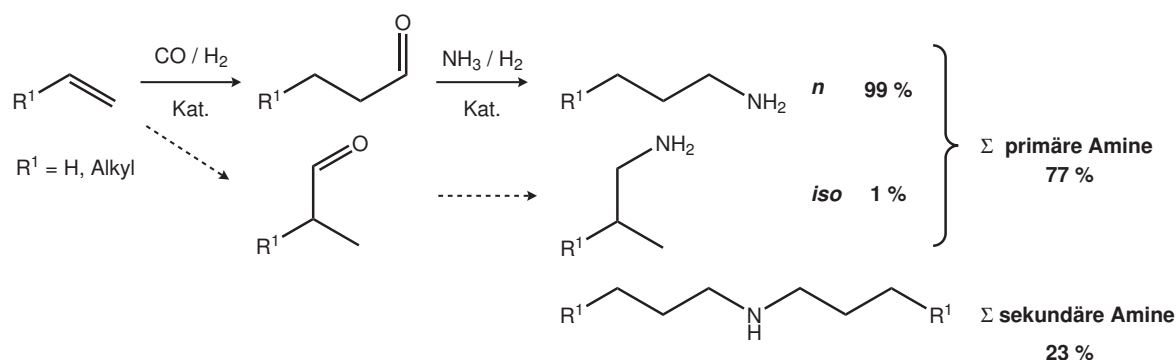


Abb. 4-28 Mechanismus der Hydroaminomethylierung mit CO/H₂ (+ Kat.) und Ammoniak sowie das molare Verhältnis der erhaltenen primären (n und iso) und sekundären Amine^[175].

4.7 Hydroaminomethylierung der Allyl-Modellsubstanz

In Kooperation mit Prof. M. Beller und Dr. R. Jackstell am Leibniz-Institut für Katalyse e.V. Rostock wurden Versuche zur Hydroaminomethylierung von Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) mit Morpholin und Benzylamin durchgeführt (Abb. 4-29). Als Katalysator diente [Rh(cod)₂]BF₄ / Xantphos (1:1,3 mol/mol). Die Reaktanden wurden unter Argon-Schutzatmosphäre in MeOH / Toluol (1:1, v/v) im Schlenkrohr zur Ausbildung des Rh-Xantphos-Komplexes für 1 h bei RT gemischt. Anschließend erfolgte die Überführung in 100 mL Autoklaven, in welchen mit CO/H₂ (p = 10:50, bar/bar) mehrere Tage bei 120 °C hydroaminomethyliert wurde (siehe Tabelle Reaktionsbedingungen). Zur sauren Katalyse der Hydrierung wurde entweder HBF₄ oder Ammoniumacetat zugesetzt. Diese protonieren das intermediär gebildete Imin und verschieben das Gleichgewicht in Richtung Enamin, welches sich besser hydrieren lässt. Auf diese Weise soll das terminale Amin (*anti*-Markownikow-Produkt) als Hauptprodukt erhalten werden, d.h. die *n* : *iso*-Selektivität zugunsten des *n*-Amins verschoben werden (vgl. Abb. 4-28).

Die Reaktionsmischungen wurden nach Abschluss der Hydroaminierung direkt mittels GC-MS analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Ansätze mit Benzylamin (vgl. Tab. 4-14, Einträge 1 und 2) sowohl mit Tetrafluorborsäure als auch mit Ammoniumacetat keinen Erfolg brachten. Beide GC-MS Analysen zeigten keine Signale des Methyl-2,3-di-*O*-(4-benzylamino-butyl)-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**16**) (siehe Abb. 4-29), sondern lediglich das Edukt **3** (R_t = 36,50 min, vgl. auch Abb. 4-30).

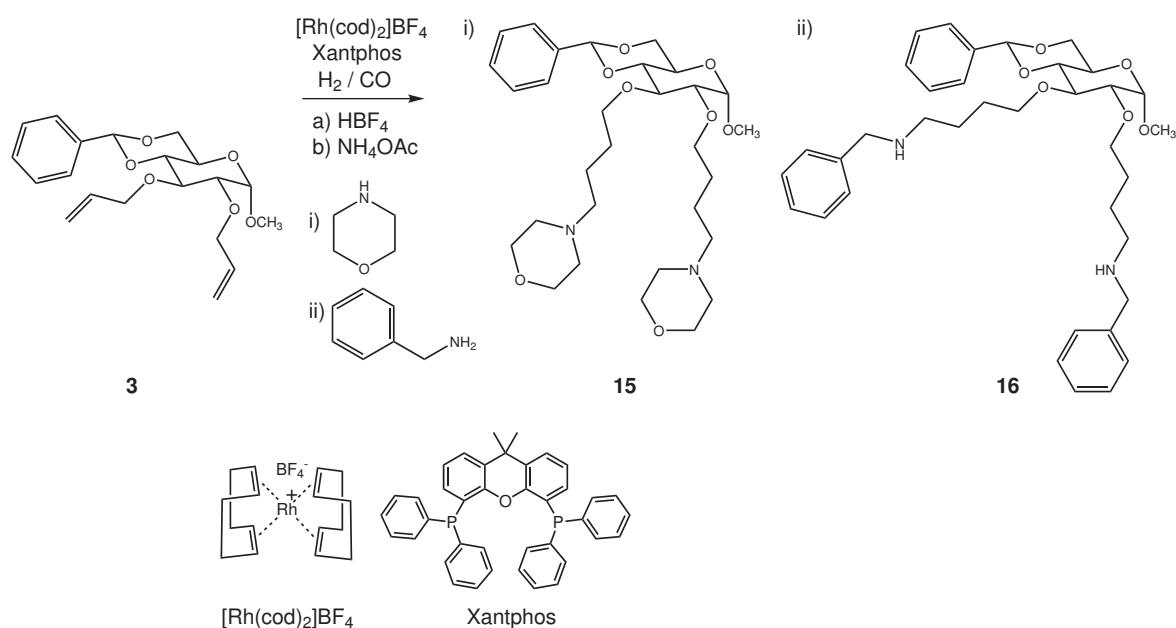


Abb. 4-29 Hydroaminomethylierung von Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) mit Morpholin (**15**) und Benzylamin (**16**). Unten: Struktur der verwendeten Katalysatoren und Liganden.

Die Hydroaminierungen mit Morpholin (vgl. Tab. 4-14, Einträge 3 und 4) wiesen hingegen ein neues Signal bei 47,45 min auf, dessen EI-Massenspektrum dem Zielprodukt Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(4-*N*-morpholinobutyl)- α -D-glcp (**15**) zugeordnet werden konnte (vgl. Abb. 4-30 und Abb. 4-31, GC-EI-MS nach säulenchromatographischer Auftrennung; siehe Kapitel 11.3.11).

Tab. 4-14 Übersicht über Hydroaminomethylierungen von Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) mit Benzylamin und Morpholin, CO/H_2 und dem Katalysator Xantphos / $[\text{Rh}(\text{cod})_2]\text{BF}_4$, Reaktionen jeweils bei 120 °C.

Amin, Äq./allyl	Säure	Kat. ¹⁾	p CO / p H ₂ [bar]	Lösungsmittel 1:1 (v/v)	t [h]	Umsatz
BnNH ₂ , 1,3	HBF ₄	0,10 / 0,13	10/50	MeOH / Toluol	24	-
BnNH ₂ , 1,4	NH ₄ OAc	0,10 / 0,13	10/50	MeOH / Toluol	24	-
Morpholin, 1,2	HBF ₄	0,10 / 0,13	10/50	MeOH / Toluol	48	1 : 2,4 [*]
Morpholin, 1,2	NH ₄ OAc	0,10 / 0,13	10/50	MeOH / Toluol	48	1 : 2,8 [*]

* = Werte aus mit C-Anzahl korrigierten FID-Signalen des Gaschromatographen, Verhältnis **3** : **15**

¹⁾ = Xantphos / $[\text{Rh}(\text{cod})_2]\text{BF}_4$ in [mol-%]

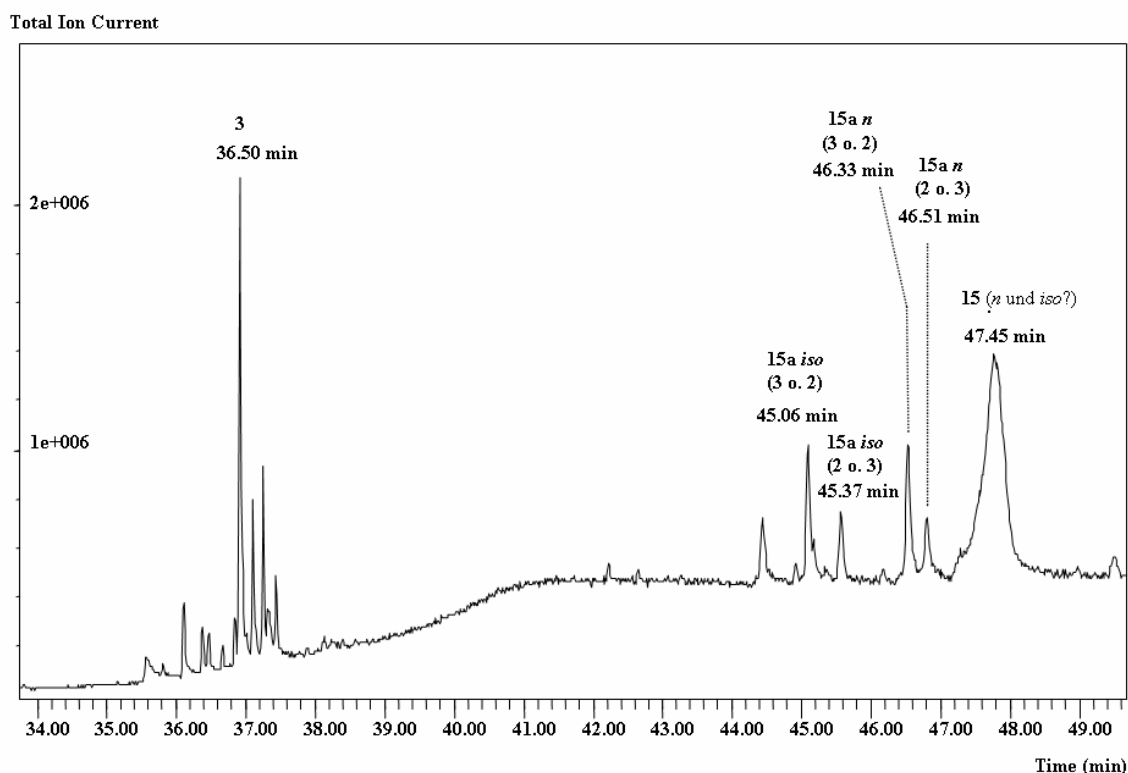


Abb. 4-30 Gaschromatogramm (GC-MS) des Reaktionsgemisches der Hydroaminomethylierung von Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) mit Morpholin, CO/H₂, dem Katalysator Xantphos / [Rh(cod)₂]BF₄ und NH₄OAc (Tab. 4-14, Eintrag 4). Strukturen: siehe Abb. 4-29.

Das Verhältnis der Flächen aus dem FID-Signal von **15** zu **3** beträgt ohne Korrektur 3,6 : 1 bei Einsatz von HBF₄ (Tab. 4-14, Eintrag 3) bzw. 4,3 : 1 bei NH₄OAc (Tab. 4-14, Eintrag 4). Nach Division durch die Anzahl C-Atome (**15**: C₃₀, **3**: C₂₀) zur Abschätzung des molaren Detektor-Signales verbleibt ein Verhältnis von 2,4 : 1 bzw. 2,8 : 1. Dieses zeugt von einem recht erfolgreichen Umsatz bei der Hydroaminierung mit Morpholin. Es bleibt jedoch anzumerken, dass das Signal bei 47,30 min relativ breit ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass *n*- und *iso*-Amine bzw. Gemische hieraus (insgesamt vier Isomere) gleichzeitig eluieren, wenngleich das MS eher einheitlich ist und einen derartigen Schluss nicht stützt. ¹H-NMR-Untersuchungen des säulenchromatographisch isolierten Produktes zeigten jedoch in geringer Intensität ein Signal, das einer neuen Methylgruppe (*iso*) zugeordnet werden kann (Singulett bei etwa 1,8 ppm, s.u.).

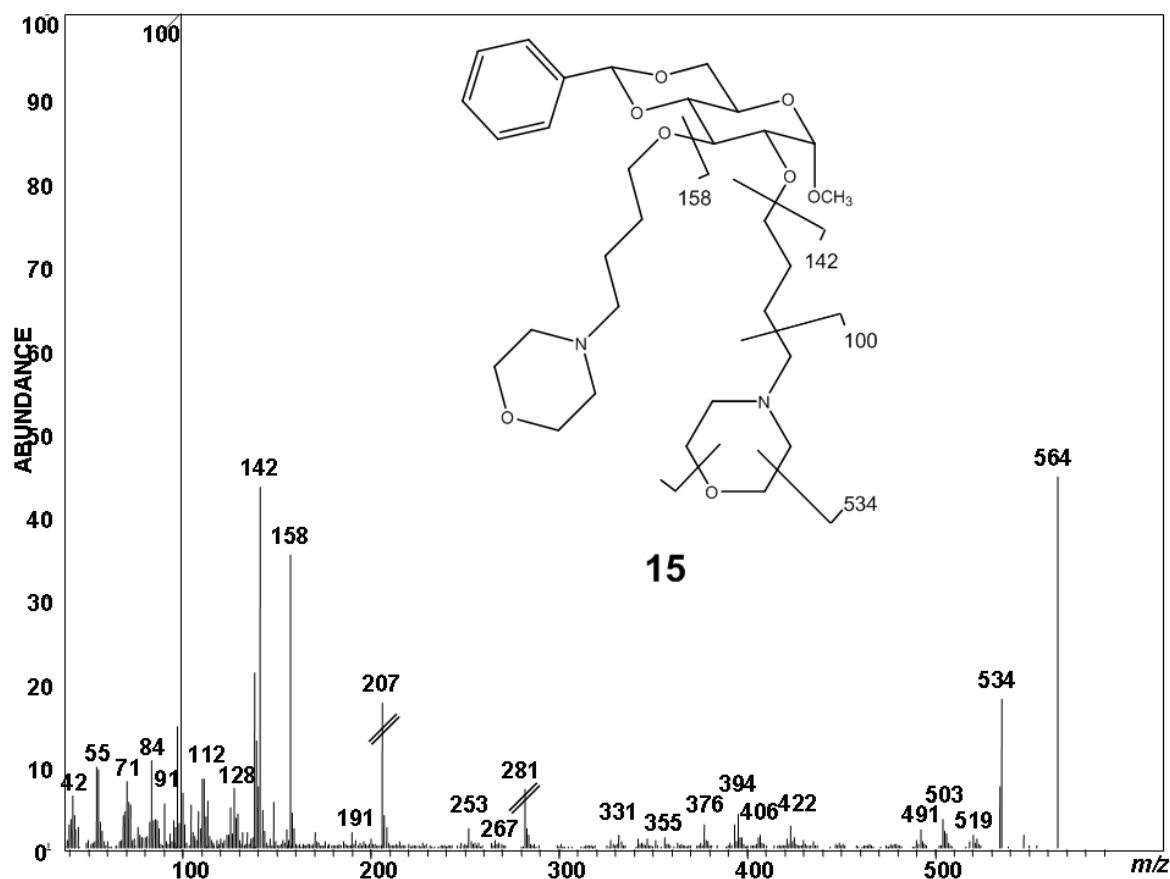


Abb. 4-31 EI-Massenspektrum des säulenchromatographisch gereinigten Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(4-*N*-morpholinobutyl)-α-D-glcp (**15**), $R_t = 47$ min in Abb. 4-30. $m/z = 207, 281$: Säulenbluten.

Im Gaschromatogramm wurden auch Signale der einfach hydroaminomethylierten Produkte **15a** bei $R_t = 45,06$ min, $45,37$ min, $46,33$ min und $46,51$ min detektiert (vgl. Abb. 4-30). Neben den isomeren Methyl-3-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden-2-*O*-(4-*N*-morpholino)butyl-α-D-glcp (**15a2 n**) und Methyl-2-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-(4-*N*-morpholino)butyl-α-D-glcp (**15a3 n**) handelt es sich bei den beiden verbleibenden Signalen vermutlich um die entsprechenden *iso*-Amine 2- bzw. 3-*O*-(2-Methyl-3-morpholino-)propyl. Alle diese Signale zeigen im EI-MS Massenzahlen von $m/z = 463$ [M^+] sowie identische Fragmente: 429, 405, 341, 158, 142, 100 (100 % rel. Intens.). In Summa beträgt das Verhältnis der FID-Flächen der Mono-morpholino-mono-allyl-Produkte **15a** zum Edukt **3** unkorrigiert 2,6 : 1 bzw. mit C-Anzahl korrigiert 2,1 : 1.

Der erfolgreichste Ansatz (Tab. 4-14, Eintrag 4, Morpholin, NH_4OAc) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt und die Fraktionen charakterisiert. Hierbei

konnten etwa 20 mg (35 μmol) **15** in nahezu reiner Form isoliert werden. Die ESI-Massenspektrometrie zeigte ein Quasimolekülion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ von $m/z = 587$, welches auch bei großer Amplitude einzig zu $m/z = 446$ $[\text{M}+\text{Na}-141]^+$ fragmentierte ($[\text{M}-\text{Morpholin}+\text{Na}]^+$). Das GC-EI-MS von **15** nach Säulenchromatographie wurde bereits in Abb. 4-31 gezeigt.

^1H -NMR-Messungen des isolierten Produktes **15** (siehe Abb. 4-32) ergaben neben den bekannten Signalen für Benzyliden-, Zuckercore- und Methoxy-Protonen neue Signale zwischen 0-3 ppm, namentlich δ (ppm) = 1,45-1,55 (m, 8 H, H-16a/b, 17a/b, 24a/b, 25a/b), 2,00-2,45 (m, 13 H, H-19a/b, 22a/b, 27a/b, 30a/b), 3,10-3,70 (m, 24 H, H-2, 3, 5, 6a/b, 15a/b, 18a/b, 20a/b, 21a/b, 23a/b, 26a/b, 28a/b, 29a/b, H-14_{a,b,c}, Zählweise siehe Abb. 4-33). Daneben treten wenige Signale auf (1,80 ppm, s, 0,7 H; 1,20 ppm, m, 1,6 H; 0,80 ppm, m, 1,8 H), die auf die Anwesenheit geringer Verunreinigungen mit *iso*-Amin-Isomer(en) ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}-$) deuten.

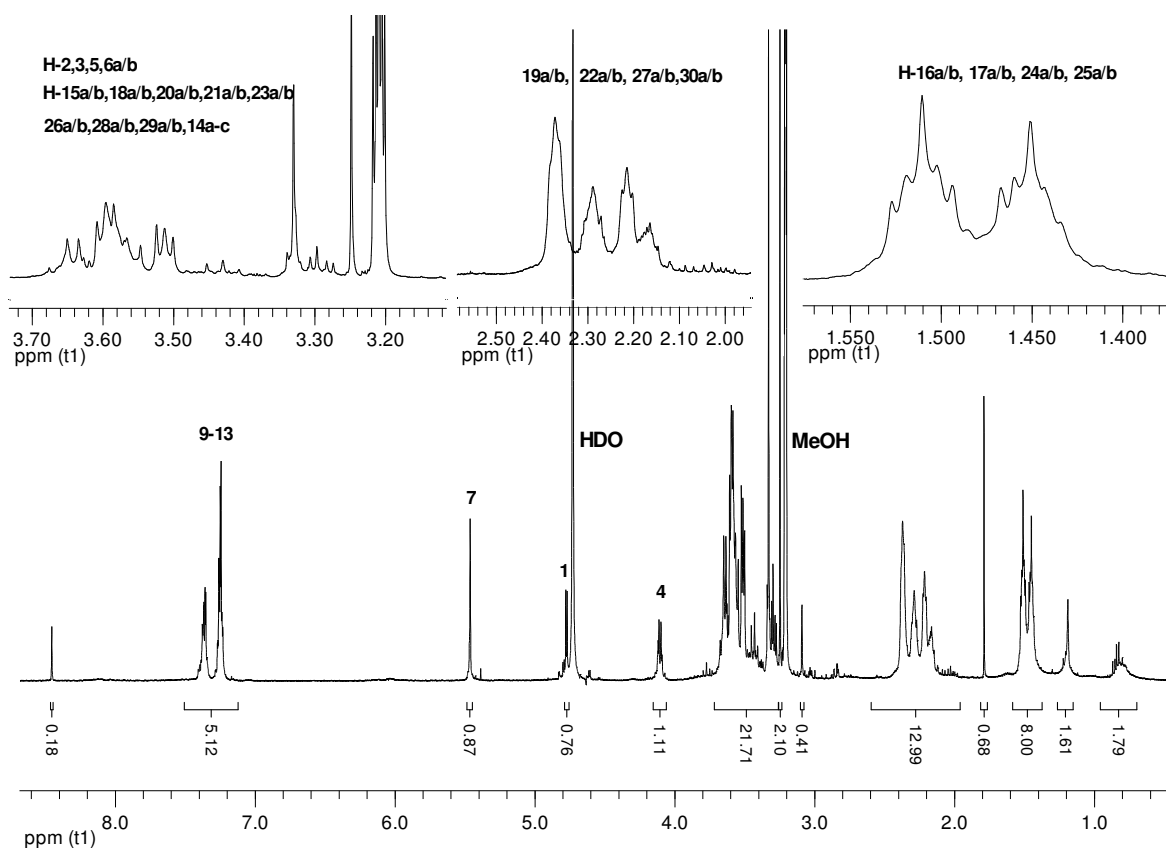


Abb. 4-32 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CD_3OD) des isolierten Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(4-*N*-morpholinobutyl)- α -D-glcp (**15**) mit Zuordnung der Resonanzen (Nummerierung siehe Abb. 4-33).

^{13}C -DEPT Messungen erlaubten eine genaue Zuordnung der Kohlenstoffatom-Resonanzen (siehe Abb. 4-33) und bestätigten die Identität von **15**. Ein zusätzliches CH_3 -Signal bei 23 ppm deutet auch hier auf geringe Spuren von *iso*-Amin-Isomeren.

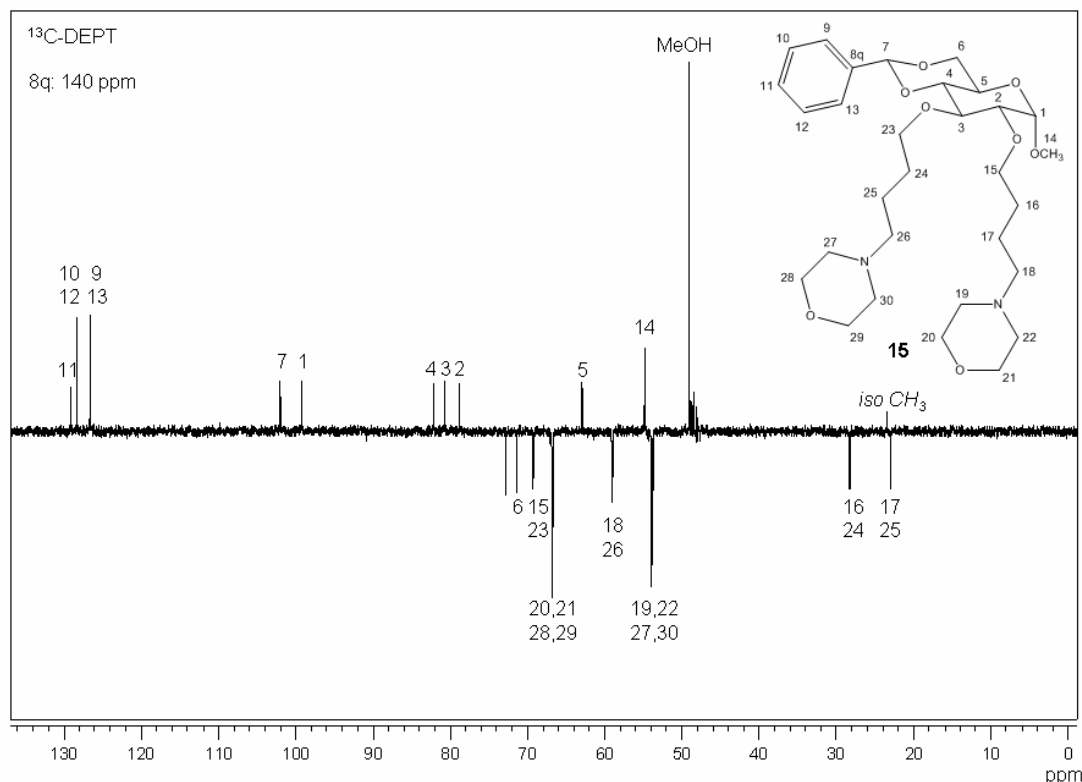


Abb. 4-33 ^{13}C -DEPT-NMR Spektrum (400 MHz, CD_3OD) des isolierten Produktes Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(4-*N*-morpholinobutyl)- α -D-glcp (**15**) mit Zuordnung der Resonanzen. Das im DEPT-Spektrum nicht erscheinende quartäre C-Atom 8q zeigt im ^{13}C -NMR-Spektrum Resonanz bei 140 ppm.

Die vier isomeren Mono-morpholino-mono-allyl-derivate **15a2 n**, **15a2 iso**, **15a3 n** und **15a3 iso** konnten nicht voneinander getrennt und in isolierter Form erhalten werden, weshalb eine genauere Zuordnung, Charakterisierung und Aufklärung der Nebenprodukte unterbleiben musste.

Zusammengefasst erscheint die Hydroaminomethylierung als geeignete Methode, um in einer „Ein-Topf-Reaktion“ aus Allyl-Kohlenhydraten Aminobutyl-derivate zu synthetisieren. Für weitere systematische Untersuchungen gilt es, die Kompatibilität mit freien OH-Gruppen auf Monosaccharid- bzw. Polysaccharidebene zu prüfen. Letztere müssen zudem in geeignetem Medium gelöst werden, ohne dass eine zu starke Viskositätserhöhung das Eindringen des Synthesegases und damit die Hydroaminomethylierung behindert.

4.8 Zusammenfassung Glucose-Modellsubstanzen

Ausgewählte Funktionalisierungen der Doppelbindung von Kohlenhydratalkenylethern wurden anhand der synthetisierten Modellsubstanzen Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) bzw. dem homologen Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**) überprüft. Aufbauend auf den so gewonnenen Erkenntnissen sollten erfolgversprechende Reaktionen auf Alkenyldextrane übertragen werden.

Zur **Epoxidierung** der Alkenylether wurden Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Metachlorperbenzoesäure (*m*-CPBA), Dimethyldioxiran (DMD) und (Trifluormethyl)methyldioxiran (TFD) eingesetzt. Während H_2O_2 und *m*-CPBA nahezu keinen Umsatz von **3** erzielten, konnte die Epoxidierung mit *in situ* aus Aceton und KHSO_5 generiertem DMD im geschlossenen System bis auf 65 % gesteigert werden. Die Reaktion mit *in situ* aus Trifluoraceton/ KHSO_5 erzeugtem TFD in der offenen Versuchsanordnung erzielte einen Umsatz von 7 % Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**) sowie 37 % der einfach epoxidierten Produkte **5 a**, **5 b**. Die Epoxidierungsreaktion im offenen System, welche für Alkenylpolysaccharide besser geeignet erscheint, soll auf Allyldextrane angewandt werden.

Bei der ***N*-nucleophilen Ringöffnung** des Modell-Diepoxids **5** mit dem sterisch wenig anspruchsvollen Diethylamin konnte ein Umsatz von 71 % erzielt werden, wohingegen Ammoniak nicht zu der erhofften Öffnung zu den primären Aminen führte. Um letztere zu erhalten, wurden die reduzierbaren Amine Benzylamin und Dibenzylamin sowie Natriumazid zur nucleophilen Ringöffnung der Oxirane eingesetzt. Bei dem erfolgreichsten Versuchsansatz mit NaN_3 wurden mit acht Äquivalenten pro Epoxid nach drei Tagen Reaktionszeit in Methanol/ LiClO_4 bei RT 82 % Methyl-2,3-di-*O*-(3-azido-2-hydroxypropyl)-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**9**) erhalten. Die Reduktion dieses Derivates zum Amin wurde in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft, ist jedoch mit Raney-Nickel, LiAlH_4 , NaBH_4 oder PPh_3 prinzipiell möglich. Mit Benzylamin wurde das gewünschte Produkt Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**10**) mit guter Ausbeute erhalten, jedoch traten hier Dimere auf, welche vermutlich durch intra-/intermolekulare Addition eines Aminoderivates (**10**) und eines Epoxypropyl-Derivates (**10a/10b**) entstehen. Mit Dibenzylamin traten derartige

Reaktionen erwartungsgemäß nicht auf; hier wurde Methyl-2,3-di-*O*-(3-dibenzylamino-2-hydroxypropyl)-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**11**) als Hauptprodukt mit bis zu 48 % Ausbeute erhalten, wobei der für Umsetzungen am Polymer entscheidende Umsatz sehr viel höher lag. Sowohl das Benzylaminderivat **10** als auch das Dibenzylaminderivat **11** ließen sich mit Wasserstoff (30 bar) und Pd/C katalytisch zum entsprechenden 3-Amino-2-hydroxypropyl-Derivat hydrieren.

Das im Vergleich zu Aminen reaktivere Cysteamin (Aminoethanthiol) ermöglicht eine direkte Einführung der Aminogruppe über die ***S*-nucleophile Ringöffnung** der Oxirane. Bei der Modellsubstanz **5** traten neben dem gewünschten Zielprodukt, welches mit guter Ausbeute erhalten wurde, aufgrund von Verunreinigungen des Reagenzes mit Cystamin Nebenprodukte auf, welche jedoch nach Reinigung des Reagenzes vermeidbar sind. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die nucleophile Ringöffnung mit Cysteamin auch auf Alkenylpolysaccharide angewandt werden.

Die Epoxidierung mit anschließender nucleophiler Ringöffnung erfordert zwei Reaktionsschritte. Sie liefert komplexe Gemische von Stereoisomeren und es besteht zudem die Gefahr intra- und intermolekularer Vernetzung, welche bei der Verwendung von Alkenylether als Intermediate gerade vermieden werden sollte. Daher soll auf der Ebene der Alkenylpolysaccharide auch die radikalische Thioladdition als mögliche Alternative der Aminofunktionalisierung überprüft werden.

Die in Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Katalyse e.V. Rostock durchgeführte **Hydroaminomethylierung** von **3** mit Morpholin, Synthesegas (CO/H₂), NH₄OAc und Xantphos/[Rh(cod)₂BF₄] als Katalysator erwies sich als geeignete Methode, um aus Allyl-Kohlenhydraten Aminobutylderivate zu synthetisieren. Für weitere systematische Untersuchungen sollte hier die Kompatibilität mit freien OH-Gruppen auf Monosaccharid- bzw. Polysaccharidebene überprüft werden.

5 Analytik von Polysaccharidderivaten

Bevor die Einführung von Alkenylsubstituenten in einer polymeranalogen Reaktion diskutiert wird, sollte man sich die Natur der Polysaccharide und insbesondere die der eingesetzten Dextrane vor Augen führen. Die strukturelle Komplexität der Polysaccharide findet sich in verschiedenen Bereichen: auf der *supramolekularen* Ebene (Kristallinität, Verknäulung, Wasserstoffbrückenbindungen), auf *Polymerebene*: Polydispersität (Molekulargewichtsverteilung), Verzweigungsgrad, Defekte der idealen Kettenstruktur durch oxidative Prozesse (Peeling), Verteilung von Substituenten auf verschiedenen Polymersträngen (Heterogenität erster Ordnung), Verteilung der Substituenten innerhalb eines Polymerstranges (Heterogenität zweiter Ordnung), auf *Oligomerebene* sowie auf *Monomerebene* (Nachbargruppeneffekte und Substitutionsmuster innerhalb einer AGU). Diese strukturellen Ebenen gilt es im Blick zu behalten, um die Bandbreite analytischer Mittelwerte richtig zu bewerten. Vergleiche mit statistischen Modellen helfen dabei, Abweichungen von einem vereinfachten, idealisierten Verhalten zu finden und so Besonderheiten einer Reaktion und der Produkte aufzudecken.

Im Folgenden werden Konzepte und Strategien zur Strukturanalyse von Dextran- und anderen Polysaccharidderivaten auf den verschiedenen strukturellen Ebenen kurz vorgestellt. Eine ausführliche Zusammenstellung der verschiedenen Möglichkeiten zur Analytik der chemischen Struktur von Glucanenderivaten (Stärke und Cellulose) findet sich bei Mischnick *et al.*^[177].

5.1 Substituentenverteilung innerhalb der AGU

Die durchschnittliche Anzahl substituierter Positionen pro Anhydroglucoseeinheit (AGU) ist definiert als Substitutionsgrad (Degree of Substitution, DS) und wird wie folgt berechnet:

$$DS = n(\text{substituierte OH Gruppen}) / AGU \quad (1)$$

$$= (3 c_3 + 2 c_2 + c_1) / 100 \quad (2)$$

mit $c_0 = s_0$

$$c_1 = s_2 + s_3 + s_4$$

$$c_2 = s_{23} + s_{24} + s_{34}$$

$$c_3 = s_{234}$$

folgt

$$DS = (3 s_{234} + 2 (s_{23} + s_{24} + s_{34}) + s_2 + s_3 + s_4) / 100 \quad (3)$$

s_i sind die Molenbrüche der AGUs, welche in Position i substituiert sind, bei Dextranen in der Hauptkette also die Positionen 2, 3 und 4 der Glucose. Damit gilt $\sum s_i = 1$. Die relative molare Zusammensetzung wird häufig in Mol-% angegeben. c_i bezeichnet Monomerbausteine, die eine Anzahl i an Substituenten tragen (c_1 = mono-, c_2 = di-, c_3 = tri-substituiert) (Abb. 5-1). Für verzweigte Polysaccharide wie Dextrane ist eine Erweiterung der Formel erforderlich, da hier neben den Positionen 2, 3 und 4 je nach Verzweigungsgrad in unterschiedlichen Anteilen auch Position 6 der terminalen AGUs substituierbar ist. Während terminale Bausteine bei Stärke oder Cellulose aufgrund ihres geringen Anteils üblicherweise vernachlässigt werden können, müssen sie bei Dextranen wegen der höheren Reaktivität der C-6-OH im Vergleich zu C-4-OH bei Stärke / Cellulose berücksichtigt werden. Hierdurch erhöht sich die Anzahl verschiedener Monomere ($\text{Monomeranzahl} = \text{Anzahl verschiedener Substituenten}^{\text{Anzahl OH Positionen}}$) von $2^3 = 8$ auf $2^4 = 16$. Die resultierende Formel für den DS-Wert muss hier daher vollständig lauten:

$$DS = (4 c_4 + 3 c_3 + 2 c_2 + c_1) / 100 \quad (4)$$

mit $c_0 = s_0$

$$c_1 = s_2 + s_3 + s_4 + s_6$$

$$c_2 = s_{23} + s_{24} + s_{34} + s_{26} + s_{36} + s_{46}$$

$$c_3 = s_{234} + s_{236} + s_{346} + s_{246}$$

$$c_4 = s_{2346}$$

folgt

$$DS = [4 s_{2346} + 3 (s_{234} + s_{236} + s_{346} + s_{246}) + 2 (s_{23} + s_{24} + s_{34} + s_{26} + s_{36} + s_{46}) + s_2 + s_3 + s_4 + s_6] / 100 \quad (5)$$

Alternativ ist der DS als Summe der Partial-DS-Werte x_i angebbbar:

$$DS = \sum x_i = x_2 + x_3 + x_4 \quad (6)$$

mit

$$x_2 = (s_2 + s_{23} + s_{24} + s_{234})$$

$$x_3 = (s_3 + s_{23} + s_{34} + s_{234})$$

$$x_4 = (s_4 + s_{34} + s_{24} + s_{234})$$

Für die verzweigten Dextrane ergibt sich wiederum:

$$DS = \sum x_i = x_2 + x_3 + x_4 + x_6 \quad (7)$$

mit

$$x_2 = (s_2 + s_{23} + s_{24} + s_{26} + s_{246} + s_{236} + s_{234} + s_{2346})$$

$$x_3 = (s_3 + s_{23} + s_{34} + s_{36} + s_{234} + s_{236} + s_{346} + s_{2346})$$

$$x_4 = (s_4 + s_{34} + s_{24} + s_{46} + s_{246} + s_{234} + s_{346} + s_{2346})$$

$$x_6 = (s_6 + s_{36} + s_{26} + s_{46} + s_{236} + s_{246} + s_{346} + s_{2346})$$

Für Polysaccharidderivate, welche Tandemreaktionen eingehen können (z.B. Hydroxyalkyl-Derivate), ist zusätzlich die Definition eines molaren Substitutionsgrades (molar degree of substitution, MS) notwendig. Dieser ist definiert als die Anzahl Substituenten pro AGU:

$$MS = n (\text{Substituenten}) / \text{AGU} \quad (8)$$

$$= \sum_{n=0}^{n=\infty} n \cdot \frac{c_n}{100} \quad (9)$$

Der MS-Wert ist theoretisch nicht limitiert, wohingegen der DS-Wert in Polyglucanen zwischen 0 und 3 liegt. Das MS/DS- Verhältnis (wobei laut Definitionen gilt: $MS \geq DS$) ist ein wichtiger Strukturparameter bei höher substituierten Hydroxypropyl-^[178] oder Hydroxyethylcellulosen.

Verschiedene Methoden zur Bestimmung der Substitution auf Monomerebene sind gut etabliert und je nach Fragestellung und Polysaccharidderivat anwendbar. Im Gegensatz zu zahllosen Beispielen zur Analytik der Monomermuster bei (kommerziellen) Cellulose- und Stärkederivaten, ist über diese analytische Fragestellung bei Dextranderivaten nur wenig literaturbekannt^[179-181]. Mit gewissen Einschränkungen durch die Natur dieser verzweigten Polysaccharide sind die für Cellulose und Stärke entwickelten Methoden prinzipiell auch auf entsprechende Dextranderivate anwendbar.

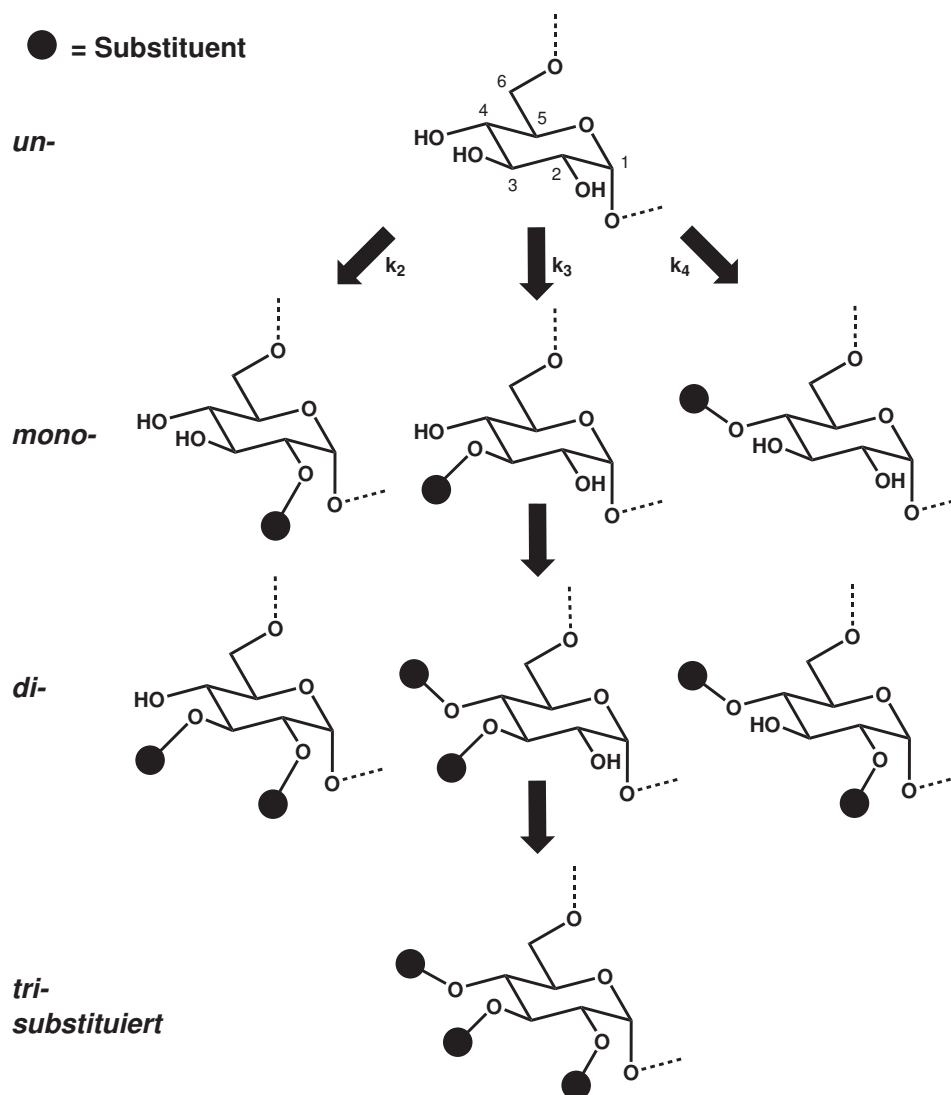


Abb. 5-1 Prinzip des polymeranalogen Umsatzes und resultierende Monomermuster am Beispiel von Dextranderivaten. Terminale und verzweigte AGUs wurden in dieser schematischen Darstellung vernachlässigt.

Ein sehr altes und in der Industrie heute noch übliches Verfahren ist die Bestimmung des DS-Wertes von Ethern als Summenparameter nach der **Zeisel-Methode**^[182-184]. Bei dieser werden die Substituenten (z.B. Methylether) mit Iodwasserstoffsäure (HI) zu Alkenen und Alkyljodiden gespalten, welche anschließend gaschromatographisch quantifiziert werden. Vor allem in Gegenwart von Heteroatomen im Substituenten (N, S, Si, P, Halogene) dient die **Elementaranalyse** zur Abschätzung des DS-Wertes (Bsp: Cyanoethyl-dextrane^[55], Diethylaminoethyl-dextrane, Dextransulfate, Dextranphosphate). Bei Fehlen von Heteroatomen kann das C/H-Verhältnis einen Anhaltspunkt für den Substitutionsgrad geben. Dieser Wert ist allerdings oft ungenau und fehlerbehaftet, da Feuchtigkeit,

Verunreinigungen mit Nebenprodukten oder Restgehalte an Reagenzien und Salzen das Ergebnis verfälschen (vgl. Abschnitt 6.4.1.2).

Für bestimmte Derivate kann der Gehalt an Substituenten **titrimetrisch** (acidometrisch) erfasst werden. Hier seien als Beispiele Carboxymethyldextran^[185] ($pK_{a\text{ CM}} \sim 4$) und Dextran-Acetat nach Verseifung genannt. Als Summenparameter lässt sich der DS-Wert mitunter auch spektroskopisch bestimmen, wie z.B. **FT-IR** (NH-CO-CH₃ in Chitin/Chitosan^[186]), nach Kalibrierung **UV-Spektroskopie** für Derivate mit Chromophor (Benzylether, Benzoate, Tritylether) oder **Photometrie** nach Farbreaktion z.B. bei Aminogruppenhaltigen Derivaten^[187].

Über das Intensitätsverhältnis von ausgewählten Substituenten- zu Zuckercore-Protonensignalen kann der durchschnittliche DS-Wert mittels **¹H-NMR-Spektroskopie** bestimmt werden (Beispiel: Dextran-Methacrylat^[188]). Aufgrund von Signalverschiebungen durch Substitution (z.B. Tieffeldverschiebung von H-3 um 1,5 ppm bei Veresterung in Position C-3), lassen sich in vielen Fällen auch die partiellen DS-Werte x_i in den Positionen 2, 3 und 4 ermitteln. Auch **¹³C-NMR-Spektroskopie**, unter Bedingungen aufgenommen, die eine quantitative Auswertung erlauben, lässt die Bestimmung des DS- und der Partial-DS-Werte zu. Hoch- bzw. Tieffeldverschiebung von ¹³C-Signalen durch Substitution derselben oder der benachbarten Position ermöglicht die Zuordnung zu den einzelnen C-Atomen (Beispiel: Dextran-Sulfat^[7], Dextran-Methacrylat^[189]). Um durch eine herabgesetzte Viskosität und bessere Löslichkeit schmalere Signale zu erhalten, werden vor der NMR-Messung der Polysaccharide häufig saure-, Ultraschall- oder enzymatische Partialabbauten durchgeführt oder aber eine Peracylierung vorgeschaltet (Bsp: Methylcellulose^[190], Hydroxypropylcellulose^[178]).

Neben dem DS als Summenparameter erhält man detailliertere Informationen über die substituierten Positionen innerhalb der AGU (Partial-DS-Werte x_i) nach dem Abbau des Dextrans zu seinen einzelnen Monomerbausteinen. Hierbei ist der erste Schritt, der Totalabbau durch saure Hydrolyse oder Methanolyse (MeOH/H⁺), sowohl der zentrale als auch der kritische Schritt der Analyse, da eine (un)selektive Abspaltung labiler Substituenten oder andere Nebenreaktionen wie z.B. Hydroxymethylfurfural-Bildung auftreten können. Nach der Spaltung aller glykosidischen Bindungen schließen sich die im

Folgenden genannten verschiedenen chromatographischen oder elektrophoretischen Trenntechniken an.

Zur Analytik mittels **Kapillarelektrophorese (CE)** erfolgt zumeist eine reduktive Aminierung mit einem fluoreszierenden oder UV-aktiven Reagenz (z.B. Aminobenzonitril), um die Detektion der Zucker zu ermöglichen^[191,192]. In einem Boratpuffer bei hohem pH-Wert liegen die erhaltenen Aminodeoxyalditole als Boratkomplexe vor und sind damit electrophoretisch mobil. Die Trennung der einzelnen Regioisomere erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Stabilität der gebildeten Boratester (cis > trans, 1,2-diole > 1,3-diole). Ein großer Nachteil der Bestimmung des Monomermusters mittels CE ist die Notwendigkeit synthetisch schwer zugänglicher Zuckerstandards zur Identifizierung der Bausteine. Eine Abschätzung ist in der Praxis häufig die Aufnahme von UV-Spektren mittels Dioden Array Detektion (DAD) und der Vergleich der quantitativen Ergebnisse mit einer unabhängigen Referenzmethode. Alternativ kann die Kopplung mit einem Massenanalysator (z.B. CE-ESI-IT-MS) eingesetzt werden^[193], wobei jedoch flüchtige Puffer mit guter Trennleistung erforderlich sind, was häufig der limitierende Faktor bei dieser Variante ist.

Die Trennleistung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (**HPLC**) ist in der Regel nicht ausreichend, um alle mono- und disubstituierten Regioisomere einzeln zu quantifizieren. Daher beschränken sich viele Methoden auf die Erfassung der Summen c_0 bis c_3 und der Berechnung des Substitutionsgrades hieraus^[194]. Die Detektion der Substanzen erfolgt durch universelle Detektoren wie Brechungsindex- (RI) oder Evaporative Light Scattering- (ELS) Detektoren oder die Kopplung mit (ESI-)MS. Nach reduktiver Aminierung mit Chromophoren oder Fluorophoren (vorgeschaltet oder Nachsäulenreaktion On-Line) ist auch UV- bzw. Fluoreszenzdetektion möglich.

Die gepulste amperometrische Detektion (PAD) wird häufig in Kombination mit der High-Performance (auch: pH) Anion-Exchange Chromatography (**HPAEC**) eingesetzt^[192,195]. Die Trennung auf Dionex[®]-Säulen erfolgt mit wässriger NaOH als Eluent (pH >12). Die Anzahl und Größe der pK_a -Werte (i. d. R. zwischen 12 und 14) verschiedener Monomerbausteine variieren je nach Substitutionsmuster, woraus unterschiedliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase und damit eine Trennung der Regioisomere resultiert^[196]. Bei der PAD werden die Zucker an der Gold-Arbeits Elektrode schrittweise oxidativ von C-1 bis zur Ameisensäure abgebaut. Da dieser Abbau durch die Blockierung

der OH- durch Substituenten gestoppt wird, ist die Sensitivität der Detektion gegenüber verschiedenen Regioisomeren sehr unterschiedlich. Auch der lineare Bereich der Detektion ist sehr begrenzt. Diese Umstände erfordern die aufwändige Kalibrierung und Bestimmung der Responsefaktoren mit synthetisierten Zucker-Standards für jeden einzelnen Monomerbaustein, weshalb sich diese Methode hauptsächlich in der Routineanalytik für denselben Probenotyp durchgesetzt hat.

Für Methylglucane besteht die Möglichkeit, die Monomeranalytik mittels **ESI-MS/CID** (Collision Induced Dissociation) durchzuführen^[197]. Nach chemischer Vereinheitlichung durch Perdeuteromethylierung und anschließendem hydrolytischem Partialabbau kann die Position der Methylgruppen innerhalb eines Disaccharids anhand dessen charakteristischer Fragmentierung im MS² und MS³ abgeleitet werden (siehe Abschnitt 6.1.2.8).

Die Methode der Wahl bei komplexen Monomer-Gemischen (z.B. Hydroxyalkyldextrane) ist die Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (**GC-FID**), ggf. gekoppelt als **GC/MS**. Notwendige Voraussetzung für diese Analytik ist die Überführung der Zuckerbausteine in flüchtige und thermisch stabile Derivate. Dabei muss das Substitutionsmuster entweder vollständig erhalten bleiben oder nach Maskierung verbliebener OH-Gruppen z.B. durch Peralkylierung die zunächst vorhandenen Substituenten gänzlich gespalten werden, um so das komplementäre Monomermuster zu erhalten (Bsp: Dextranacetate^[198]). Spezifische (z.B. 2-*O*-Allyl, siehe Abb. 6-5, Bildung von 1,6-Anhydroderivaten) oder unspezifische Nebenreaktionen (z.B. Bildung verschiedener Anhydroderivate oder Reversionsprodukte, Hydroxymethylfurfural-Bildung) müssen bei der Derivatisierung zur Gaschromatographie möglichst vermieden werden. Idealerweise erhält man nach Derivatisierung nur einen einzigen Peak für einen bestimmten Monomerbaustein, um eine ausreichende Trennleistung zu gewährleisten. Verschiedene Methoden sind in der Kohlenhydratanalytik gut etabliert. Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung, entweder direkt oder nach Permethylierung der Glucane, liefern partiell substituierte Sorbitacetate (Alditolacetat-Methode)^[194,199]. Die Massenspektren sind einfach zu interpretieren und die Identifizierung daher zumeist eindeutig^[200]. Vor allem bei unpolaren Substanzen ist die Spaltung durch Methanolyse (MeOH/H⁺) mit anschließender Maskierung der OH-Gruppen durch Acetylierung oder Silylierung die Methode der Wahl, welche α - und β -Methylglucoside liefert^[179]. Die von Gray *et al.*^[201] eingeführte Glykosidspaltung unter Katalyse einer Lewis-Säure (z.B. TMS-

Triflat) mit anschließender Reduktion des erhaltenen Carboxoniumions zum Anhydroalditol durch Triethylsilan (so genannter Reduktiver Abbau) ist eine alternative und schnelle Methode, um zuvor peralkylierte Derivate zu den 1,5-Anhydroalditolen abzubauen^[177]. Diese Variante ist insbesondere für säurelabile Derivate wie z.B. Dextranacetat geeignet.

Die quantitative GC-FID-Auswertung bedient sich aufgrund fehlender Standards zur Kalibrierung des Effective-Carbon-Response (ECR) Konzeptes. Dieses berücksichtigt das unterschiedliche Ionisierungsverhalten der verschiedenen Monomere in der Flamme aufgrund der variierenden chemischen Umgebung der C-Atome^[202-205]. Somit lassen sich die relativen molaren Anteile der einzelnen Monomerbausteine bestimmen.

5.2 Substituentenverteilung entlang der Polymerkette

Nach der Bestimmung der unterschiedlich substituierten Glucose-Monomere und ihres jeweiligen relativen Anteils im Polymer, stellt sich die Frage, wie diese Bausteine entlang des Polymerstranges verteilt sind (Abb. 5-2). Von besonderem Interesse ist diese Analyse, da die Struktur-Eigenschaftsbeziehung vor allem durch die Verteilung der Substituenten im Polymer geprägt ist. Die Kombinationsmöglichkeiten der Glucosyleinheiten sind nahezu unbegrenzt. Bereits bei 40 AGUs ($M_w \sim 6.5$ kDa) gibt es theoretisch 10^{47} verschiedene Variationen, so dass die Wahrscheinlichkeit, innerhalb des Dextranderivats zwei identische Polymerstränge anzutreffen, gegen null geht.

Da eine Sequenzanalyse, wie für die strukturell genau definierten Proteine zur Bestimmung der Aminosäurenreihenfolge üblich, für die komplexen Molekülgemische der Polysaccharide nicht möglich ist, untersucht man stattdessen nach statistischem Partialabbau die erhaltenen Oligomere^[179,206,207]. Sie geben Aufschluss über benachbarte Glucosyleinheiten und dienen als Repräsentanten des Polymers. Nach erfolgtem partiellem Abbau schließt sich die quantitative massenspektrometrische Analyse bestimmter Oligomer-Fractionen an. Die experimentellen Befunde werden mit der entsprechenden zufälligen Verteilung für diesen DP verglichen, welche sich anhand der analysierten Monomerzusammensetzung und der partiellen DS-Werte x_i berechnen lässt (vgl. Abschnitt 6.1.2.6). Abweichungen von dieser statistischen Verteilung geben Hinweise auf Heterogenitäten (z.B. infolge unterschiedlich guter Aktivierung) und Nachbargruppeneffekte im Polymermaterial^[208]. Notwendige Voraussetzungen für den Erhalt

repräsentativer Oligosaccharide sind 1) sämtliche glykosidische Bindungen müssen in gleicher Weise zugänglich sein, 2) die Hydrolyserate der glykosidischen Bindungen darf nicht signifikant abhängig vom Substitutionsmuster sein.

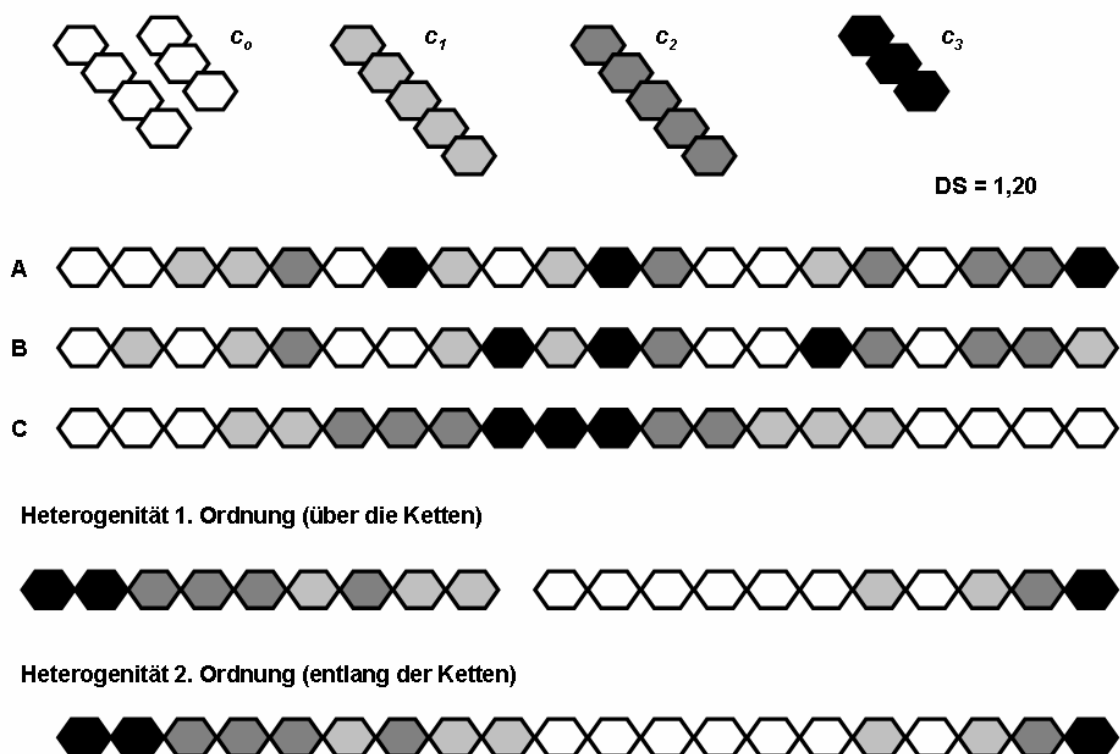


Abb. 5-2 Schematische Darstellung der verschiedenen Heterogenitäten über oder entlang der Polysaccharidketten bei einem DS von 1,20.

Um den Einfluss der verschiedenen Substitutionsmuster auf die Hydrolyserate möglichst zu vermeiden, werden in einem ersten Schritt die Polysaccharidderivate chemisch vereinheitlicht (Bsp.: Methyl-dextran \rightarrow Perdeuteromethylierung^[179]). Drastische Abbaubedingungen wie hohe Temperaturen und starke Säurekonzentrationen sollen eine mögliche Selektivität des Abbaus vermindern bzw. möglichst nivellieren. Die massenspektrometrische Analyse der Oligomere kann mittels FAB-MS^[206], MALDI-ToF-MS oder ESI-IT-MS erfolgen. Um quantifizierbare Messungen zu erhalten, kann entweder die chemische Vereinheitlichung^[197] oder aber ein Labelling durch reduktive Aminierung mit einem geladenen Agens wie *n*-Propylamin und nachfolgender Quarternisierung mit

Methyliodid^[208-210] zum Erfolg führe, um Unterschiede in der Ionisierung zu nivellieren (siehe Abschnitte 6.1.2.8 und 7.2).

Ein anderer Ansatz zur Bestimmung der Substituentenverteilung entlang der Polymerkette ist der enzymatische Verdau des Polysaccharidderivates^[177]. Die chemische Modifizierung beeinflusst durch ihre Art, ihr Ausmaß (DS) und ihr Substitutionsmuster (tendenziell blockartig, statistisch) die Abbaubarkeit durch Enzyme, da die Substituenten mit dem aktiven Zentrum interferieren. Ein Maß für die Verteilung der Substituenten im Polymer ist die enzymatisch freisetzbare Glucosemenge^[42]. Je länger die unsubstituierten Sequenzen sind, d.h. je heterogener das Polysaccharid bei identischem DS substituiert ist, desto mehr Glucose kann freigesetzt werden^[211]. Weiterhin gibt die Analyse der freigesetzten Oligosaccharide mittels HPLC, SEC, NMR oder MS Aufschluss über die Substituentenverteilung im Polymer, sofern die Charakteristika des aktiven Zentrums bzw. des Enzym-Substrat-Komplexes und die Toleranz gegenüber chemischer Modifizierung des Substrates bekannt sind. Das Wissen über letztere ist jedoch noch begrenzt, so dass eine generelle Vorhersage des Abbauergebnisses derzeit noch nicht möglich ist. Umfassende Studien über enzymatische Abbaubarkeiten liegen für verschiedene Cellulose-^[212-214] und Stärkederivate^[215-217] vor. Bei Arbeiten über Cellulasen zeigte sich, dass die Ausbildung des zur Katalyse notwendigen aktiven Komplexes zwischen Enzym und dem Substrat Cellulosederivat (MC, CMC) je nach Enzym zwischen vier und acht Einheiten Glucose zur Wechselwirkung umfassen kann^[213,214,218]. Hierbei sind auch der Ort und die Regioselektivität der Substitution entscheidend. Während z.B. eine Carboxymethylgruppe in Position *O*-3 an der -1 Untereinheit von Carboxymethylcellulose von bestimmten Endoglucanasen toleriert wird, verhindert eine Substitution in *O*-2 oder *O*-6 die Hydrolyse^[218] (vgl. Abb. 5-3). Die Enzyme sind in ihrer Aktivität somit unterschiedlich tolerant gegenüber Substitution.

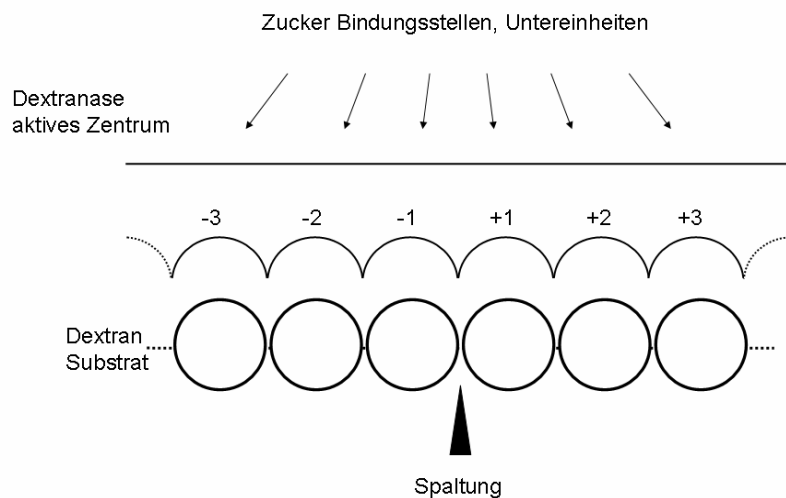


Abb. 5-3 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums einer Dextranase sowie die Nomenklatur der zur Bindung an das Substrat erforderlichen Untereinheiten (binding subsites).

Das in der vorliegenden Arbeit für den Abbau von Dextranen und Dextranderivaten eingesetzte Enzym ist Dextranase (E.C. 3.2.1.11), eine 1,6- α -D-Glucan-6-glucanohydrolase, welche die Endohydrolyse der α -1 \rightarrow 6-D-glucosidischen Bindungen des Dextrans katalysiert^[219]. Glykosidische Verzweigungen (α -1 \rightarrow 2, α -1 \rightarrow 3, α -1 \rightarrow 4) bleiben unberührt. Studien über die Charakteristika dieses Enzyms und seine Toleranz gegenüber Substitution liegen derzeit jedoch nicht vor, so dass hier noch Pionierarbeit geleistet werden muss. In dieser Arbeit wurden Abbaustudien von Methyl- und Allyldextranen sowie nativen Dextranen mit Dextranase aus *Chaetomium erraticum* (Sigma) durchgeführt. Die freigesetzte Glucosemenge wurde analysiert und mit der Substituentenverteilung im Polymer in Bezug gesetzt (siehe Abschnitte 6.1.2.7 und 7.3).

5.3 Substituentenverteilung über die Polymerketten

Nach einem statistischen Partialabbau für die Oligomeranalytik erhält man Durchschnittswerte für die Verteilung. Die Information über die Art der Heterogenität im polymeren Ausgangsmaterial geht auf diese Weise jedoch verloren, so dass nicht mehr zwischen Heterogenität erster Ordnung (über verschiedenen Ketten) oder zweiter Ordnung (entlang eines Stranges) unterschieden werden kann (vgl. Abb. 5-2). Um hierüber detailliertere Einblicke zu gewinnen, ist es notwendig, das Ausgangsmaterial zu

fraktionieren und das Mono- und Oligomermuster der erhaltenen Fraktionen separat zu analysieren. Die Fraktionierung nach DS und/oder DP kann dabei durch Extraktion mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität^[220], stufenweises Ausfällen^[221] oder Size Exclusion Chromatography (SEC; Trennung nach hydrodynamischem Radius)^[222] erfolgen. Auf diese Weise können Bestandteile identifiziert werden, welche vom Mittel des Polymers mehr oder weniger stark abweichende Heterogenitäten und Substitutionsmuster aufweisen. Das Zusammenspiel verschiedener Moleküle zum resultierenden Gesamtbild (z.B: Lösungsvermittlung durch höher substituierte Moleküle^[220]) wird auf diese Weise zu verstehen versucht.

6 Alkenyldextrane

Nachdem in Kapitel 3.1 bereits allgemein die Synthese von Polysaccharid-*O*-Alkenylethern vorgestellt worden ist, werden in diesem Abschnitt die eigenen Ergebnisse und Erfahrungen bei der Darstellung von Allyl- und Pentenyldextranen diskutiert. Neben verschiedenen Reaktionsparametern, welche die Eigenschaften der erhaltenen Derivate entscheidend beeinflussen (siehe Abschnitt 6.1.1), liegt der Schwerpunkt auf der strukturellen Charakterisierung der erhaltenen Produkte (Abschnitt 6.1.2).

6.1 Allyldextrane

6.1.1 Synthese von Allyldextranen

Dextrane von *Leuconostoc* spp. mit verschiedenen mittleren Molekulargewichten im Bereich von 6 bis 500 kDa wurden auf zwei grundsätzlich verschiedene Arten in einer Williamsonschen Veretherung in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu Allyldextranen umgesetzt.

Die Hydroxygruppen des Dextrans ($pK_a \sim 12-14$) werden durch den Zusatz einer Base deprotoniert, um so reaktive Alkoholationen zu erzeugen. Diese reagieren im zweiten Schritt mit dem zugesetzten Allylhalogenid. Die Deprotonierung des Dextrans kann dabei auf verschiedene Weisen erfolgen. Verwendet man Lithiumdimethylsilyl (Methylsulfinylmethanid) als Base, so liegt ein homogenes System aus in DMSO gelöstem Dextran und Base vor. Bei Einsatz von NaOH zur Aktivierung des Polysaccharids wird dieses in feinverteilter Form (z.B. gemörst) als Feststoff zu der DMSO-Dextran-Lösung gegeben. Die Deprotonierung erfolgt bei dieser heterogenen Reaktion nur an der Kontaktfläche zwischem festem NaOH und dem Dextran, weshalb hier eine große Oberfläche, d.h. möglichst kleine Partikel, sehr wichtig ist. Die Basenstärke der NaOH ist zudem um etwa 20 pK-Werte schwächer als die des Dimethylsilyl-Anions.

Als Allylierungsreagenzien wurden Allylhalogenide eingesetzt. Deren Reaktivität nimmt in der Reihenfolge $\text{All-I} > \text{All-Br} > \text{All-Cl}$ aufgrund der besseren Polarisierbarkeit und der daraus resultierenden steigenden Nucleofugie der Halogene ab. Diese erhöhte Reaktivität ist jedoch auch verantwortlich für die Instabilität des Reagenzes, welches in der Folge zu Nebenreaktionen neigt. So wird beispielsweise bei Verwendung von All-I ein schwarz braunes Produkt erhalten, was auf die Zersetzung des Reagenzes zu I_2 und $(\text{All})_2$ zurückzuführen ist. Alkenylpolysaccharide, welche mit dem im Vergleich zu All-Cl

reaktiveren All-Br hergestellt wurden, waren in der Regel stärker bräunlich gefärbt, was ebenso auf stärkere Nebenproduktbildung hindeutet. Zur Synthese von Allyldextranen wurde daher neben Allylbromid das zwar reaktionsträgere aber stabilere Allylchlorid eingesetzt. Die Ausbeute der Allylierungsreaktion war mit All-Br und All-Cl vergleichbar.

Bei den Synthesen der Allyldextrane wurden die Äquivalente an Base und Allylierungsreagenz pro OH-Gruppe variiert. Die Alkylierungen wurden i. d. R. bei Raumtemperatur für 2-3 Tage durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde überschüssiges Allylierungsreagenz im Hochvakuum entfernt und im Anschluss meist eine Dialyse gegen destilliertes Wasser durchgeführt, um DMSO und Base zu entfernen. Nach Gefriertrocknung der wässrigen Rückstände wurde auf diese Weise eine große Sammlung an Allyldextranen mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Substitutionsgraden von 0,08 bis 2,51 erhalten (siehe Kapitel 11.6).

Bevor in Kapitel 6.1.2.5 der Einfluss der Reaktionsparameter auf den Substitutionsgrad und das Monomermuster diskutiert wird, soll im Folgenden die Charakterisierung der Derivate sowie die Methodenentwicklung zur gaschromatographischen DS-Bestimmung vorgestellt werden.

6.1.2 Strukturelle Charakterisierung von Allyldextranen

In früherer Zeit wurden vor allem chemische Methoden zur Bestimmung des Allyl-Substitutionsgrades eingesetzt. Hierzu zählen die der Iodzahlbestimmung entsprechende *Wijs*-Methode^[84] (Addition von Iod an Doppelbindungen) und die Bestimmung ungesättigter Gruppen mittels Pyridin-Sulfat-Dibromid Methode nach *Rowe*^[85]. In Zeiten moderner instrumenteller Analytik begnügt man sich jedoch nicht mit der Bestimmung des mittleren Substitutionsgrades, der mittels Elementaranalyse, NMR oder IR zugänglich ist, sondern möchte die Verteilung auf die unterschiedlichen Positionen innerhalb der AGU erfassen (siehe hierzu Kapitel 5.1). Hierzu hat sich insbesondere die Gaschromatographie als geeignete Methode etabliert. Die genannten Methoden sowie ihr Einsatz zur Charakterisierung von Allyldextranen werden im folgenden Kapitel erläutert.

6.1.2.1 ATR-IR-Spektroskopie

Die Attenuated Total Reflection (abgeschwächte Totalreflexion)-Infrarot-Spektroskopie (ATR-IR) wird zur Charakterisierung von Polysaccharidderivaten gerne eingesetzt, da die zu untersuchende Probe direkt als Feststoff aufgegeben und mit Infrarotlicht bestrahlt wird. Die Intensität des reflektierten Lichtes wird gemessen und lässt Rückschlüsse über das absorbierende Medium zu. Besonders zur Überprüfung einer Peralkylierung (Abwesenheit von OH-Valenz-Schwingungen bei $3200\text{--}3570\text{ cm}^{-1}$ und Deformationsschwingungen δ (OH) bei 1265 cm^{-1}) von Polysaccharidderivaten ist die ATR-IR eine schnelle Methode.

Typische ATR-IR-Spektren der Allyldextrane (M_w 500 kDa) mit verschiedenen DS_{allyl} – Werten zeigt Abb. 6-1. Mit zunehmendem DS werden die Intensitäten der OH-Stretch-Schwingungen bei $3200\text{--}3570\text{ cm}^{-1}$ geringer. Gleichzeitig nehmen die Intensitäten der C=C-Valenzschwingung der Allylgruppen bei 1640 cm^{-1} (scharf), der =C-H-Valenzschwingung bei 3075 cm^{-1} , der C=C-H-Deformationsschwingungen bei 1005 und 915 cm^{-1} sowie die Intensität der C-O-C-Deformationsschwingung bei 1070 cm^{-1} zu.

Die ATR-IR ist zwar im Verhältnis zur KBr-Pressling-Methode weniger empfindlich gegenüber eingeschlossener Feuchtigkeit und Umgebungsfeuchtigkeit, jedoch führen diese ebenfalls zu OH-Schwingungen und können das Ergebnis verfälschen. Eine Kalibrierung mit Allyldextranen verschiedener DS-Werte und reproduzierbare Messungen der Oberflächenremission sind schwierig. Diese Methode ist daher nur zur qualitativen Abschätzung des Allyl-DS-Wertes geeignet.

6.1.2.2 Elementaranalyse

Aufgrund fehlender Heteroatome in Allyldextranen kann einzig der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt und daraus berechnet das C/H-Verhältnis einen Anhaltspunkt für den Grad der Allyl-Substitution geben. Dieser Wert ist allerdings oft ungenau und fehlerbehaftet, da Feuchtigkeit, Verunreinigungen mit Nebenprodukten oder Restgehalte an Reagenzien und Salzen das Ergebnis verfälschen. Die theoretische Abhängigkeit des C- und H-Gewichtsanteils sowie das zugehörige C/H-Verhältnis vom DS_{allyl} sind in Abb. 6-2 dargestellt.

Das C/H-Verhältnis nimmt mit steigendem DS_{allyl} von 7,15 ($DS = 0$) auf 8,12 ($DS = 3$) zu. Die zu erwartenden Unterschiede bei verschiedenem DS sind nur gering und die Methode daher extrem störanfällig (s.o.).

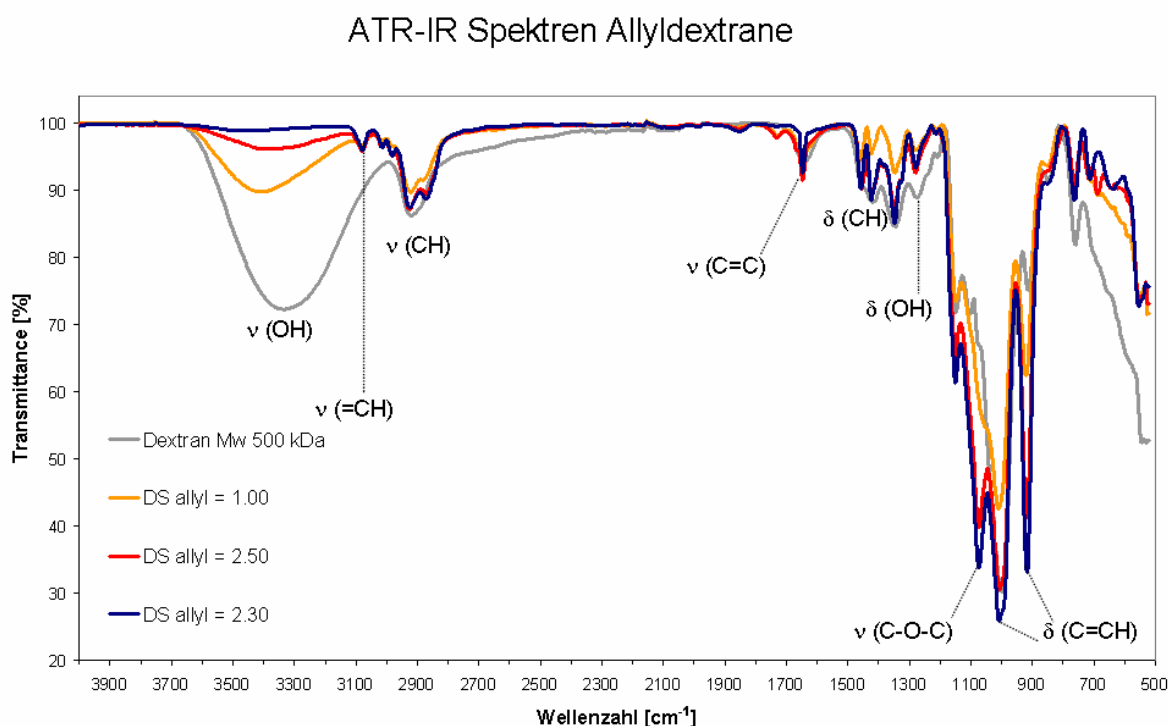


Abb. 6-1 ATR-IR-Spektren von Allyldextranen mit verschiedenen Substitutionsgraden und Zuordnung der Schwingungsarten.

Bei den synthetisierten Allyldextranen lag das durch Elementaranalyse bestimmte C/H-Verhältnis auch unter Berücksichtigung der Standardabweichung häufig über dem theoretisch maximal möglichen Wert von 8,12 (vgl. Tab. 6-1, AV 159, 161 B, 163) und i.d.R. deutlich höher, als es der aus GC-Daten erhaltene DS-Wert prognostizieren würde. Zudem bewegten sich Einzelwerte außerhalb der theoretisch möglichen w %-Bereiche (vgl. AV 162, w % H < 6 %). Hier sind offenbar Nebenreaktionen erfolgt, deren Produkte das Allyldextran verunreinigen. Die Elementaranalytik ist daher zur Bestimmung des mittleren Substitutionsgrades nicht ohne weiteres geeignet.

Einige ausgewählte Produkte wurden daher vor und nach Soxhlet-Extraktion mit Dichlormethan elementaranalytisch sowie zusätzlich mittels ATR-IR und ¹H-NMR untersucht (siehe Kapitel 6.1.2.5.7). Hierbei zeigte sich, dass nach Soxhlet-Extraktion der aus dem C/H-Verhältnis berechnete DS-Wert besser mit den GC-Werten übereinstimmt (siehe Abschnitt 6.1.2.5.7).

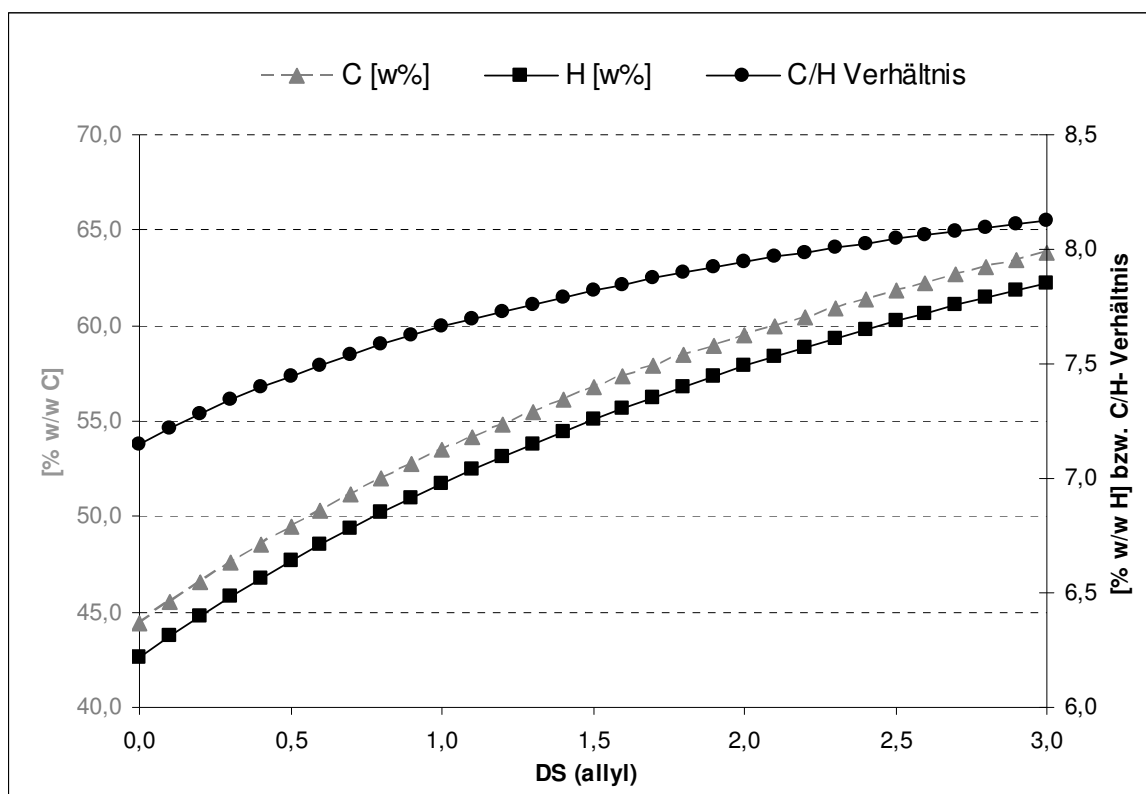


Abb. 6-2 Zusammenhang von Massenprozent C (linke Y-Achse, grau), Massenprozent H bzw. C/H-Verhältnis (jeweils rechte Y-Achse, schwarz) und dem Allyl-Substitutionsgrad DS_{allyl} .

Die Verunreinigungen könnten durch im Hochvakuum nicht entfernte Reste von Diallylether ($H_2C=CH-CH_2)_2O$ (Sdp: 94-95 °C) oder Allylalkohol $H_2C=CH-CH_2-OH$ (Sdp: 96-98 °C) hervorgerufen worden sein (siehe Abschnitt 3.2.2). Allerdings war das C/H-Verhältnis des Extraktes in beiden Fällen niedriger als das der Allyldextrane. Auf diese Weise kann das theoretisch unmögliche zu hohe C/H-Verhältnis von AV 159 vor der Soxhlet-Behandlung demnach nicht erklärt werden. Eventuell liegen hier weitere kohlenstoffreiche Nebenprodukte vor (siehe hierzu Kapitel 6.1.2.5.7).

Tab. 6-1 Beispiele für Elementaranalyse-Ergebnisse von Allyldextranen und die daraus kalkulierten theoretischen DS-Werte im Vergleich zu DS-Werten aus GC-Analysen. *= Mittelwert aus Mehrfachbestimmungen (2-3), B = braune Probenbestandteile, W = weiße Probenbestandteile.

	AV 159	AV 160	AV 161 B	AV 161 W	AV 162	AV 163
w % C *	58,66	51,95	62,35	54,59	46,18	63,17
theoretischer DS	1,87	0,80	2,63	1,15	0,15	2,82
w % H *	7,13	6,67	7,43	6,92	5,71	7,5
theoretischer DS	1,28	0,55	1,85	0,90	< 0,00	2,00
C/H *	8,23	7,79	8,39	7,89	8,09	8,42
theoretischer DS	> 3,00	1,40	> 3,00	1,80	2,80	> 3,00
DS (GC)	2,05	1,46	2,13	0,74	1,81	2,31

6.1.2.3 NMR-Spektroskopie

Die synthetisierten Allyldextrane zeigten zumeist in keinem deuterierten Lösungsmittel eine für NMR-Messungen ausreichende Löslichkeit. Lediglich bei geringen DS-Werten konnte ein ^1H -NMR-Spektrum von Allyldextran AV 170 ($\text{DS}_{\text{allyl}} (\text{GC}) = 0,86$) in Deuteriumoxid aufgenommen werden. Die Resonanzsignale sind aufgrund des Polymercharakters (M_w 15-25 kDa) erwartungsgemäß relativ breit und eher schlecht aufgelöst (siehe Abb. 6-3).

Das Allylprotonensignal (CH) bei 6,0 ppm (m, 1 H) kann eindeutig identifiziert werden. Es folgen die beiden endständigen Allylprotonen bei 5,2-5,4 ppm (m, 1,97 H). Bei den Signalen um 5,1 (s, breit, 0,51 H) und 4,9 (s, breit, 0,49 H) handelt es sich um die verschiedenen H-1 Signale. Eine Substitution in C-2 bewirkt eine Tieffeldverschiebung des $\text{H-1}_{\text{C-2-O-allyl}}$ (5,1 ppm), wogegen das H-1_{un} der in C-2 unsubstituierten AGU bei leicht höherem Feld (4,9 ppm) Resonanz erzeugt. Im Bereich zwischen 4,5-3,3 ppm (7,63 H) liegen sowohl die sechs Zucker-Protonen (H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b) als auch die Methylen-gruppen der Allylsubstituenten ($-\text{CH}_2-\text{O}-$).

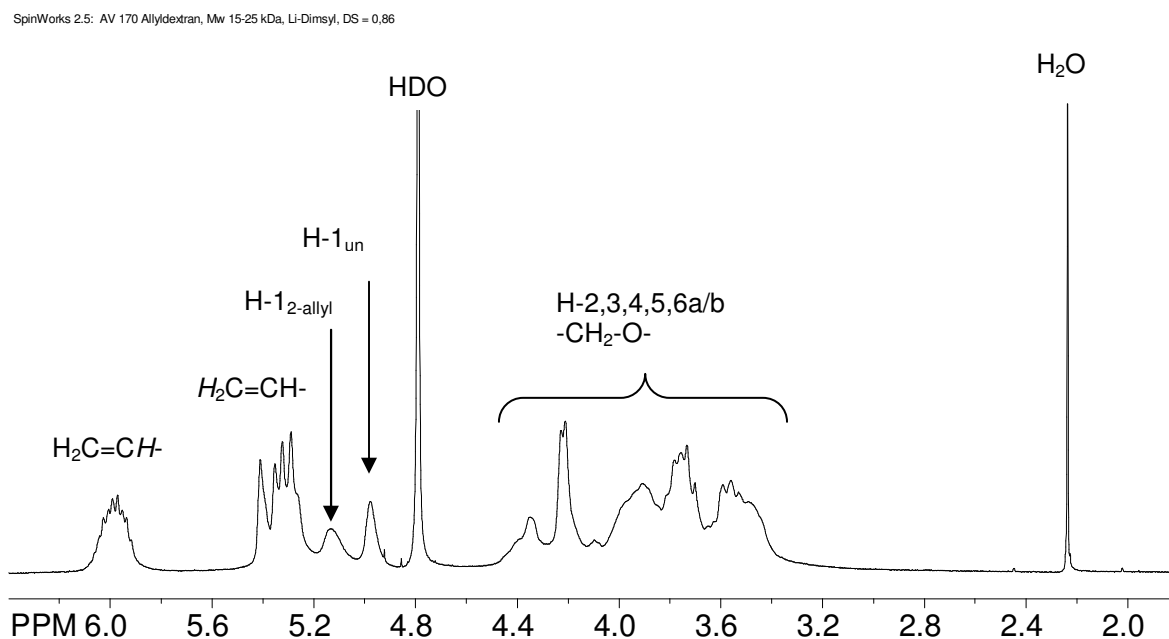


Abb. 6-3 ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Allyldextran AV 170 in D_2O , $\text{DS} (\text{GC}) = 0,86$, Ausgangsdextran $M_w = 15\text{-}25$ kDa.

Durch Relation der Integrale lässt sich der Allylsubstitutionsgrad sowie der partielle Substitutionsgrad in Position C-2 (x_2) nach folgenden Formeln abschätzen. Das Signal des Allylprotons CH_{allyl} bei 6,0 ppm wurde dabei auf 1,000 normiert.

$$DS_{allyl} = \frac{\int CH_{allyl}}{\int H-1_{2-allyl} + \int H-1_{un}} = 1,00 \quad (DS_{GC}: 0,86) \quad (10)$$

$$DS_{allyl} = \frac{\int CH_{allyl}}{\frac{1}{6} \int (H_{2,3,4,5,6a,6b,CH2} - 2)} = 1,07 \quad (DS_{GC}: 0,86) \quad (11)$$

$$x_2 = \frac{\int H-1_{2-allyl}}{\int H-1_{2-allyl} + \int H-1_{un}} = 0,51 \quad (x_2_{GC}: 0,43) \quad (12)$$

Die auf diese Weise erhaltenen Werte liegen in einem vergleichbaren Bereich wie die mittels Gaschromatographie bestimmten Daten, siehe Gl. (10) bis (12). Höher substituierte Allyldextrane wurden wegen der unzureichenden Löslichkeit einer Methanolyse (1.5 M methanolische HCl, 90 °C, 50 min) unterzogen und anschließend mittels 1H -NMR untersucht. Abb. 6-4 zeigt das NMR-Spektrum des Methanolysats von AV 159 ($DS_{allyl_{GC}} = 2,05$).

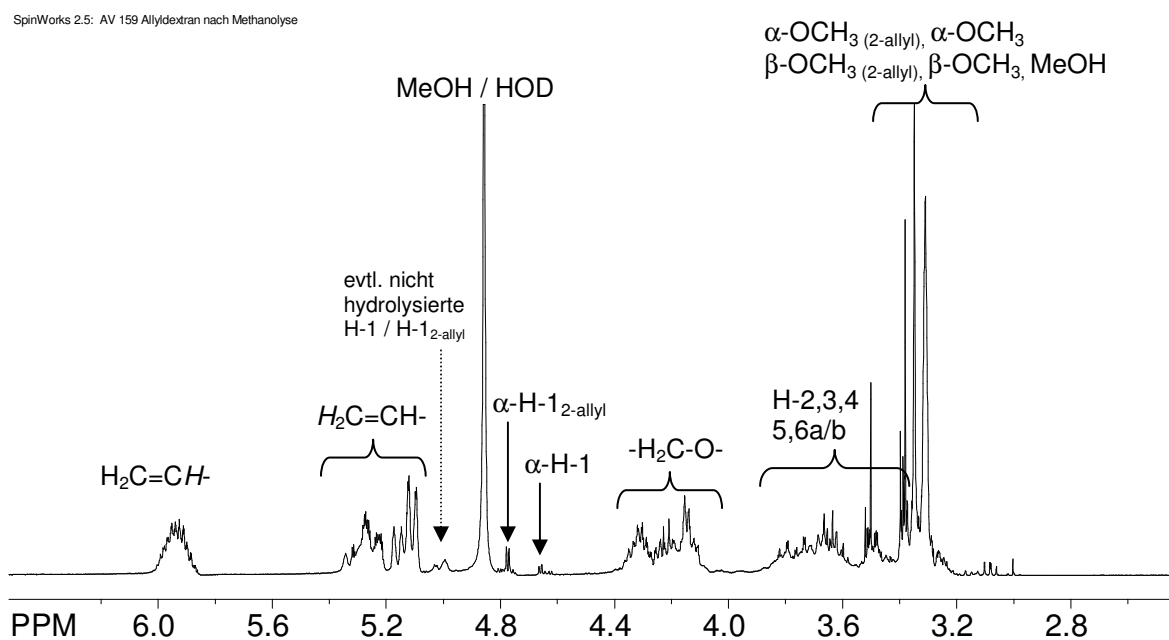


Abb. 6-4 1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_3OD) von Allyldextran AV 159 nach Methanolyse, $DS_{GC} = 2,05$; Ausgangsdextran $M_w = 40$ kDa.

Erneut ist das Allylprotonensignal (CH) bei 5,9 ppm (m, normiert auf 1,000 H) eindeutig identifizierbar (siehe Abb. 6-4). Die endständigen Allylprotonen liegen bei 5,08-5,35 ppm (m, 2,04 H). Von den verschiedenen H-1 Signalen (un, 2-allyl, je α und β) erscheinen nur die α -Signale isoliert bei 4,77 ppm ($H_{1-2-allyl}$, 3,6 Hz, 0,1 H) bzw. 4,66 ppm (H_{1-un} , 3,8 Hz, 0,03 H). Im Bereich zwischen 3,35-3,90 ppm (m, 3,03 H) liegen die Zucker-Protonen (H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b). Die Signale der β - $H_{1-2-allyl/un}$ -Protonen liegen vermutlich unter dem Signal der beiden Methylengruppen der Allylsubstituenten ($-CH_2-O-$), welche in diesem Spektrum bei 4,06-4,45 ppm (m, 2,04 H) erscheinen. Die Methylgruppen der Methylglucoside ($OCH_3_{2-allyl}$ und OCH_3_{un} , je α und β) sowie Methanol zeigen übereinanderliegende Singulets im Bereich von 3,3-3,4 ppm.

Aufgrund der von den Zuckerringprotonen getrennt liegenden CH_2 -Signale der Allylsubstituenten kann in diesem Fall der DS im Vergleich zu Gl. (11) vereinfacht berechnet werden nach Gleichung (13):

$$DS = \frac{\int CH_{allyl}}{\frac{1}{6} \int H_{2,3,4,5,6a,6b}} = 1,98 \quad (DS_{GC}: 2,05) \quad (13)$$

Dieser DS-Wert liegt im Bereich der GC-Analytik und erscheint realistisch.

Die NMR-Spektroskopie nach partieller oder vollständiger Methanolyse bietet den Vorteil, dass auch schwerlösliche Allyldextrane untersucht werden können. Jedoch wird durch den Abbau die Anzahl der Stereoisomere (α/β) erhöht und so die Zuordnung der Signale durch Überlagerungen erschwert. NMR-Analysen beschränken sich auf die Bestimmung des mittleren Substitutionsgrades sowie ggf. des partiellen Substitutionsgrades in Position 2. Zur Differenzierung der mono-, di-, tri- und tetra-substituierten Bausteine sowie der einzelnen Regioisomere innerhalb der AGU ist jedoch eine weiterführende gaschromatographische Analytik erforderlich. Diese wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

6.1.2.4 Bestimmung des Monomermusters mittels Gaschromatographie

Zur gaschromatographischen Bestimmung der Monomermuster von Allylpolysacchariden ist die Überführung in flüchtige Substanzen unter Beibehalt des ursprünglichen

Substitutionsmusters erforderlich. Die Doppelbindung der 2-*O*-Allylglucose reagiert jedoch in wässriger saurer Lösung in einer intramolekularen Addition mit dem während der Hydrolyse gebildeten Carboxoniumion zu einem sechsgliedrigen cyclischen Ether (siehe Abb. 6-5). Diese Nebenprodukte führen bei der Analytik zu Verlusten bei der Erfassung dieser 2-*O*-Allylderivate, was das Ergebnis des Substitutionsmusters verfälschen würde.

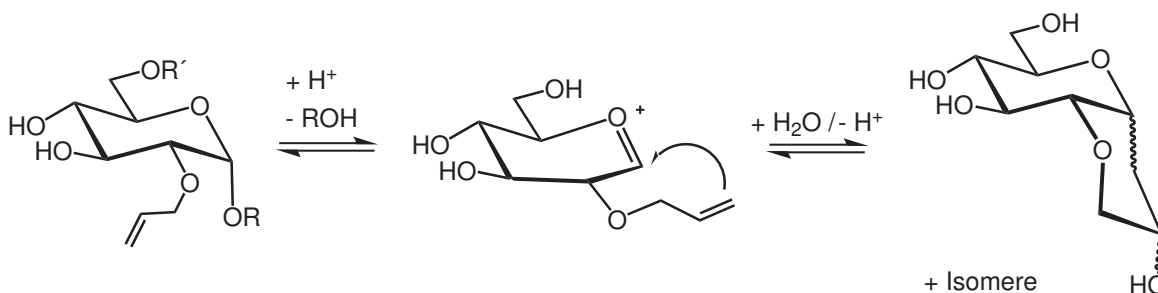


Abb. 6-5 Intramolekulare Additionsreaktion von 2-*O*-Allylderivaten an das gebildete Carboxoniumion bei der sauren Hydrolyse von Allyldextranen.

Solche Nebenreaktionen sind auch für 2-*O*-Hydroxyalkylglucose bekannt, wo es analog zu einer intramolekularen Acetalbildung kommt. Im Gegensatz zu Wasser kann Methanol erfolgreicher um das Carboxoniumion konkurrieren, so dass eine Methanolyse eine Alternative zur Hydrolyse darstellt. Der Abbau zu den Monomeren erfolgt hierbei durch trockene methanolische Salzsäure (MeOH/H^+), wobei Methylglucoside erhalten werden. Gleichzeitig wird so die Aldehydfunktion am C-1 geschützt (siehe Abb. 6-6, 1.). Das klare Methanolsat wird im Anschluss mit Wasserstoff/PdC hydriert, so dass aus den reaktiven Allylgruppen stabile Propylether entstehen (Abb. 6-6, 2.). Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit der Allyldextrane konnte die Hydrierung nicht auf der Polymerebene erfolgen, was prinzipiell eine mögliche Alternative zur vorgeschalteten Methanolyse wäre. Die Methyl-*O*-propyl-glucoside werden durch TFA wieder zu reduzierbaren Glucosiden umgesetzt (Abb. 6-6, 3.). Mit Natriumborodeuterid erfolgt die Reduktion zu C-1-*d*-Sorbit, um das Auftreten von α - und β -Glucosiden zu unterbinden und die gaschromatographische Trennung und Identifizierung zu vereinfachen (Abb. 6-6, 4.). Die freien OH-Gruppen werden im letzten Schritt propionyliert, da bei der üblicherweise durchgeführten Acetylierung eine Massengleichheit von Acetyl- und Propylgruppen ($M = 43 \text{ g/mol}$) aufträte (Abb. 6-6, 5.). Dieses würde die Identifizierung der substituierten Positionen aufgrund von charakteristischen Fragmentshifts im EI-Massenspektrum verhindern.

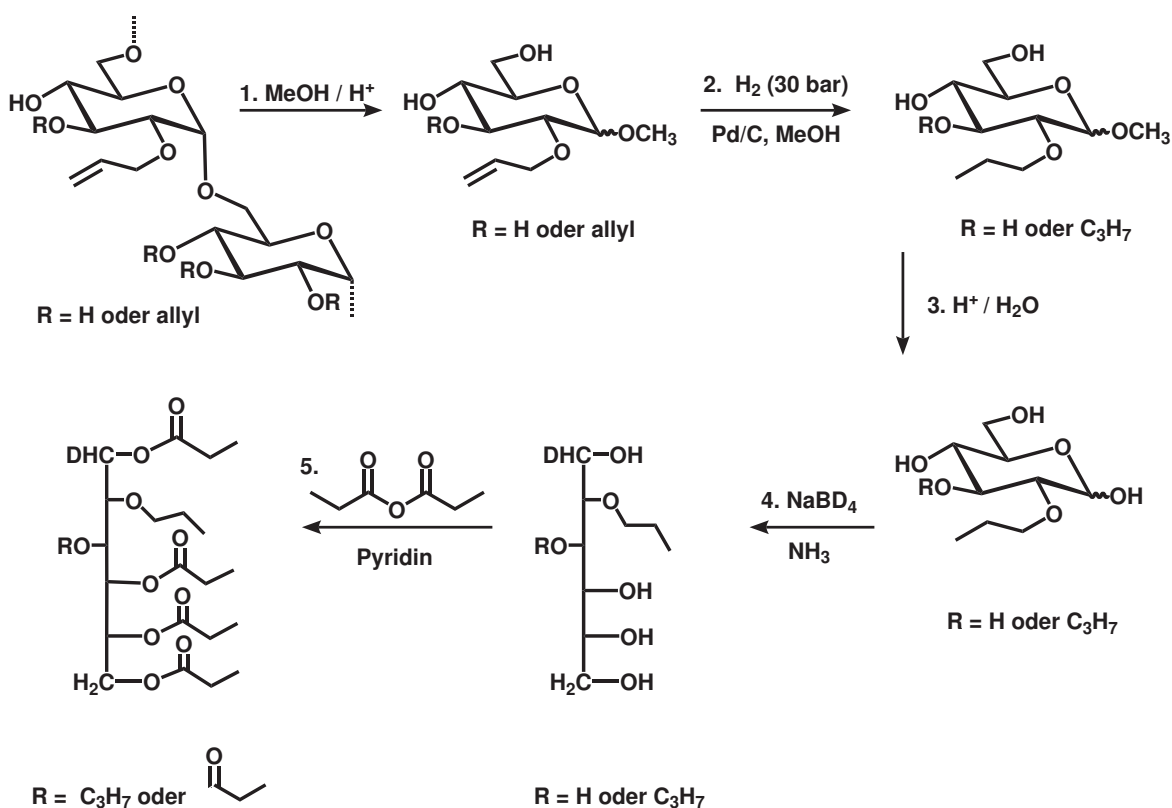


Abb. 6-6 Derivatisierung von Allyldextranen zu partiell propylierten Sorbitpropionaten für die gaschromatographische Bestimmung des Monomermusters. 1. Methanolyse, 2. Hydrierung, 3. Hydrolyse, 4. Reduktion, 5. Propionylierung.

Ein typisches Gaschromatogramm der erhaltenen partiell propylierten C-1-*d*-Sorbitpropionate ist in Abb. 6-7 dargestellt. Aus dem Signal des Flammenionisationsdetektors (FID) erhält man nach Korrektur der Flächen mittels ECR-Faktoren (siehe Abschnitte 5.1 und 11) das Allyl-Substitutionsmuster auf Monomerebene.

Es werden alle theoretisch denkbaren Kombinationen an Substitutionsmustern, d.h. un, mono (2, 3, 4, 6), di (23, 24, 26, 34, 36, 46), tri (234, 236, 246, 346) und tetra (2346) identifiziert. Substitution an C-6-OH kann jedoch bei ca. 5 % Verzweigung (siehe Tab. 6-2) nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:20 erfolgen, da die Hauptketten α -(1 \rightarrow 6)-glykosidisch verknüpft sind, so dass die Regioisomere 26, 36 und 46 nur in Spuren nachweisbar sind und unterhalb der Bestimmungsgrenze liegen. Die Häufigkeit der Allyl-Substitution innerhalb der AGU nimmt bei Dextranen in der Reihenfolge $x_2 > x_4 \geq x_3 \gg x_6$ ab.

Die Ergebnisse der Monomeranalytik der dargestellten Allyldextrane werden im folgenden Abschnitt im Zusammenhang mit den Reaktionsbedingungen der Allylierung diskutiert.

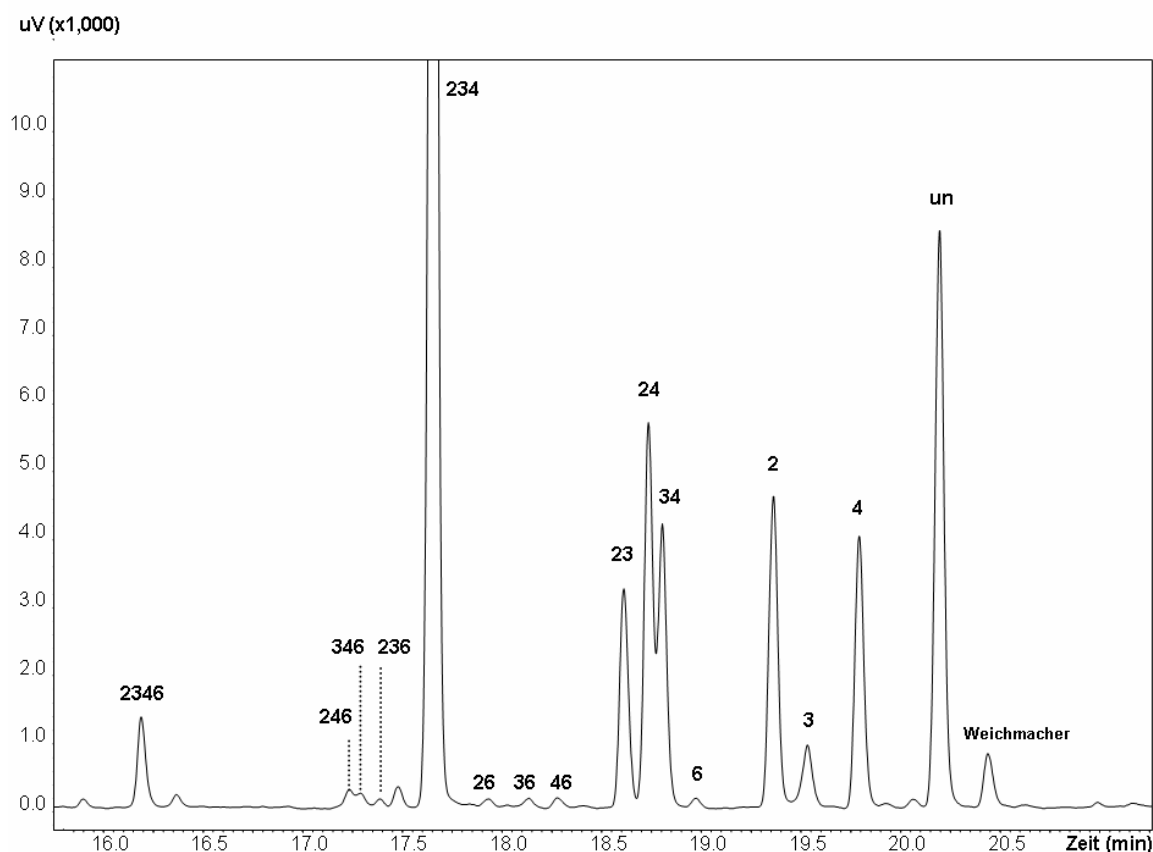


Abb. 6-7 GC-FID eines nach Abb. 6-6 zu partiell propylierten Sorbitpropionaten umgesetzten Allyldextrans, AV 128 (NaOH/ $\text{Al}(\text{Cl})_3$), $\text{DS}_{\text{allyl}} = 2,06$, M_w Ausgangsdextran 40 kDa. Säule: DB 5 (5 % Phenylmethylpolysiloxan), Trägergas: H_2 , Temperaturprogramm: $60(1^\circ)-20/\text{min}$ $200-4/\text{min}$ $250-20/\text{min}$ $310(10^\circ)$. Nummerierung bezogen auf Allyl-Positionen innerhalb der AGU.

6.1.2.5 Einfluss der Reaktionsparameter

6.1.2.5.1 Molmasse der Dextrane

Für die Synthese von Allyldextranen wurden Dextrane mit unterschiedlichem mittlerem Molekulargewicht von 6 kDa über 15-25, 40, 70 bis zu 500 kDa verwendet (Herstellerangaben, siehe Tab. 6-2). Die Verzweigungsgrade dieser Edukte wurden mittels Standardmethylierungsanalyse (SMA), d.h. nach Permethylierung, Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung, gaschromatographisch bestimmt^[199]. Alle Dextrane weisen eine Verzweigung in Position O-3 auf. Das Dextran mit einem Molekulargewicht von 15-25 kDa, welches im Gegensatz zu den anderen Dextranen (*Leuconostoc ssp. strain 10817*) von *Leuconostoc mesenteroides* produziert wurde, sowie Dextran M_r 70 kDa besitzen zudem ca. 1 % Verzweigungen in Position O-4. Die Verzweigung steigt tendenziell mit zunehmendem Molekulargewicht von 3,5 % (6 kDa) bzw. 3,0 % (15-25 kDa) über 6,0 %

(70kDa) bzw. 7,3 % (40 kDa) auf 8,9 % (500 kDa). Diese Beobachtung kann durch die Molekulargewichtseinstellung mittels partieller chemischer Hydrolyse erklärt werden (siehe Kapitel 1.2), bei welchem die labileren 1,3-Bindungen der Verzweigungen bevorzugt hydrolysiert werden. Auch die mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmte Polydispersität (M_w/M_n) der Dextrane steigt mit zunehmendem Molekulargewicht von 1,28 (6 kDa) über 1,37 (40kDa) auf 1,79 (500 kDa). Das Dextran mit einer Molmasse von 15-25 kDa, welches von einem anderen Mikroorganismenstamm produziert wurde, besitzt abweichend von diesem Trend eine geringere Polydispersität von 1,10.

Tab. 6-2 Übersicht über die eingesetzten Dextrane

M_r ¹⁾ [kDa]	M_w [g/mol] GPC	Standard- abweichung	Polydispersität M_w/M_n	Verzweigung [%] SMA			
				O-2	O-3	O-4	terminal
6 ²⁾	10520	+/- 3400	1,28	*0,0	*3,5	*0,0	*5,4
15-25 ³⁾	17640	+/- 1900	1,10	0,0	2,0	< 1,0	4,2
40 ²⁾	52700	+/- 12900	1,37	0,0	7,3	0,0	4,6
70 ²⁾	n.b.	n.b.	n.b.	0,0	5,0	< 1,0	6,9
500 ²⁾	448400	+/- 13900	1,79	0,0	8,9	0,0	6,1

Molekulargewichte: M_r = relativ (Masse bezogen auf 1/12 ^{12}C), M_w = Gewichtsmittel, M_n = Zahlenmittel
 1) = Herstellerangabe, 2) = Dextran from *leuconostoc ssp strain 10817*, 3) = Dextran from *leuconostoc mesenteroides*, SMA = Standardmethylierungsanalyse (GC), n.b. = nicht bestimmt, terminal = nicht reduzierende Kettenenden, * = GC-Werte nach Methanolyse-Trimethylsilylierung.

Mit zunehmendem Molekulargewicht wird mehr Zeit benötigt, um eine optisch klare Lösung der Dextrane in DMSO zu erhalten (Dextran 6 kDa ca. 10 min, Dextran 500 kDa ca. 2 h). Es wurden parallel Reaktionen der Dextrane M_w 6, 40 und 500 kDa mit der Base Li-Dimsyl und dem Allylierungsreagenz Allylchlorid in DMSO durchgeführt. Die Äquivalente an Base und AlCl_3 betrugen dabei in der ersten Reihe 0,75, in der zweiten Reihe 2,50 pro OH-Gruppe.

Bei Einsatz von 0,75 Äquivalenten Li-Dimsyl und AlCl_3 lag der DS zwischen 0,46 und 0,49, bei 2,50 Äquivalenten zwischen 0,95 und 1,04. Die Unterschiede in der DMSO-Löslichkeit der Ausgangsdextrane haben offenbar keinen signifikanten Einfluss auf den erzielbaren DS. Bei gleichen Bedingungen ist somit keine Abhängigkeit des erhaltenen Substitutionsgrades vom Molekulargewicht des eingesetzten Dextrans festzustellen.

Die zugehörigen Monomermuster (Abb. 6-8) sind unabhängig vom Molekulargewicht sehr ähnlich. Die Substitution innerhalb der AGU nimmt in der Reihenfolge $O-2 > O-4 \geq O-3 \gg O-6$ ab.

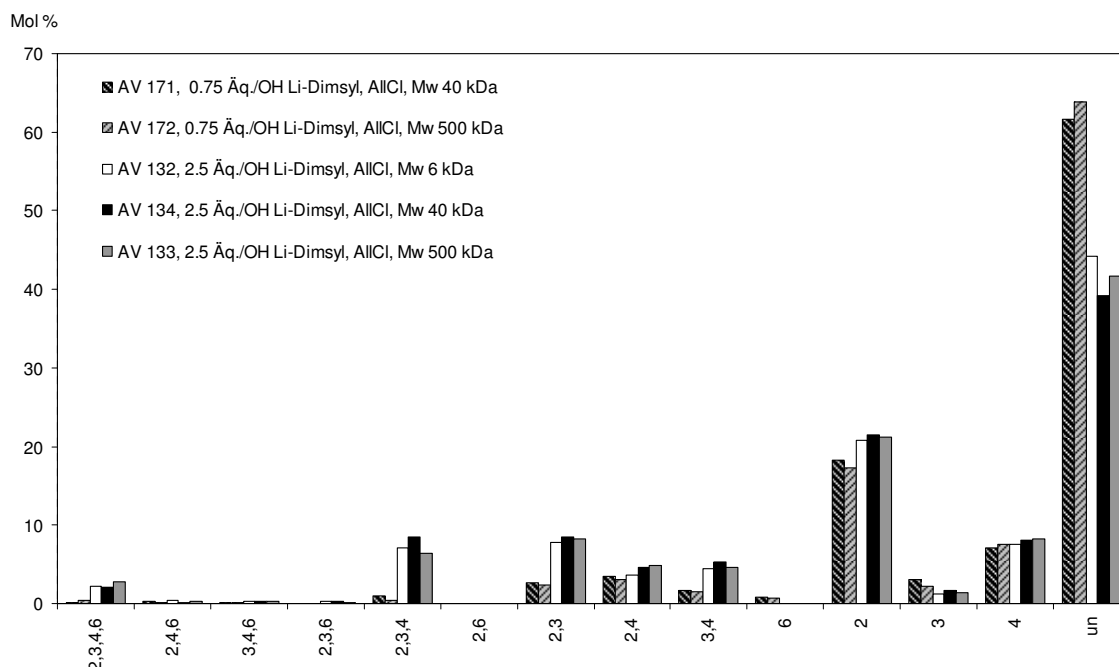


Abb. 6-8 Relative molare Zusammensetzung der unterschiedlich substituierten Glucosen aus Allyldextranen, die unter gleichen Reaktionsbedingungen (0,75 bzw. 2,50 Äq./OH Li-Dimsyl, AlCl) synthetisiert wurden.

6.1.2.5.2 Einfluss der Wahl der Base

Die Unterschiede in der Verwendung von Li-Dimsyl ($pK_a = 35$, homogenes System) und NaOH ($pK_a = 15$, heterogenes System,) als Base wurden bereits in Kapitel 6.1.1 kurz erläutert. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ist es interessant, die Monomermuster der erhaltenen Produkte sowie Abweichungen von statistischen Modellen in Abhängigkeit der verwendeten Basenart zu betrachten. Dieser Thematik widmet sich ausführlich Kapitel 6.1.2.6. Im Folgenden werden die erzielten DS-Werte in Abhängigkeit der verwendeten Basenart und der Äquivalente verglichen.

Der direkte Vergleich zweier Dextrane ($M_w = 500$ kDa), die jeweils mit ca. 1 Äq./OH Base und AlBr hergestellt wurden, zeigt Abb. 6-9. Die DS-Werte liegen bei 0,33 (Li-Dimsyl) bzw. 0,40 (NaOH). Beide Proben zeigen Substitution von O-2 (53 bzw. 51 %) > O-4 (27 bzw. 29 %) > O-3 (18 bzw. 16 %) \gg O-6 (2 bzw. 5 %). Es liegen eine nahezu statistische

Verteilung der Substituenten und mit 3,9 (AV 23D) bzw. 3,1 (AV 31) geringe Heterogenitäten H_I vor (siehe hierzu Abschnitt 6.1.2.6). Niedrige Basenkonzentrationen begünstigen deutlich die Substitution der acidesten OH-Gruppe in Position 2.

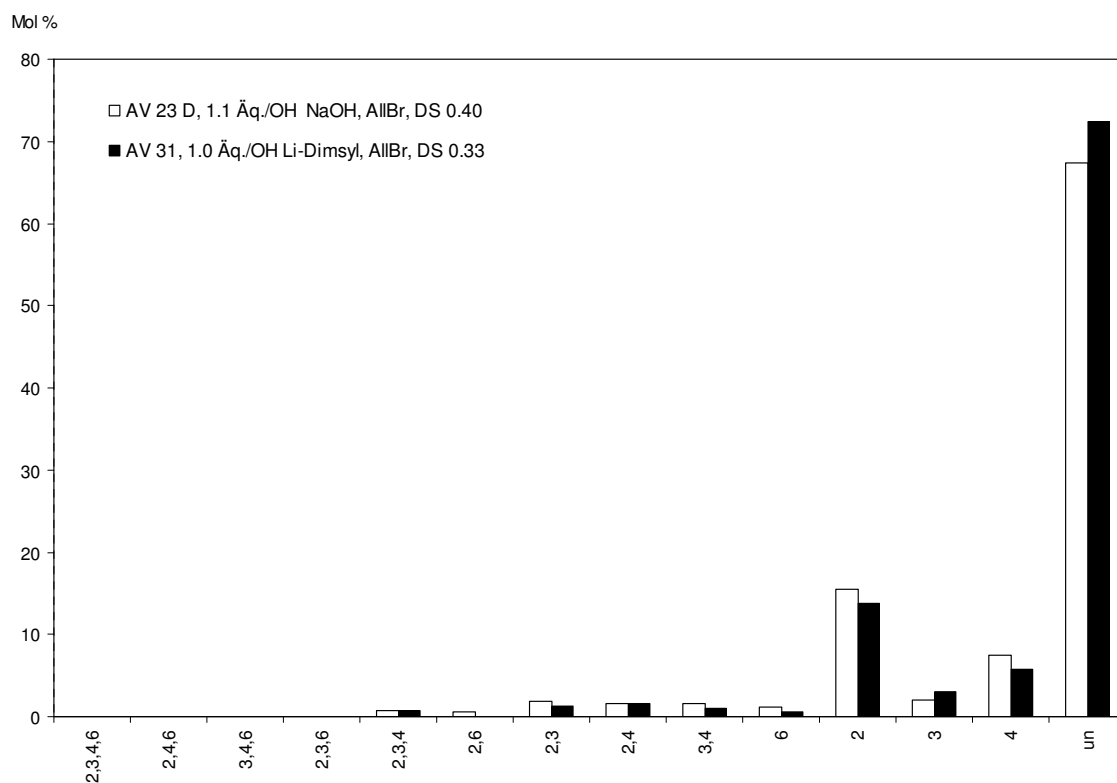


Abb. 6-9 Vergleich der Monomermuster von Dextranen M_w 500 kDa bei gleichen Äquivalenten und AIBr als Allylierungsreagenz bei verschiedener Basenart. AV 23D: **NaOH**, AV 31: **Li-Dimsyl**.

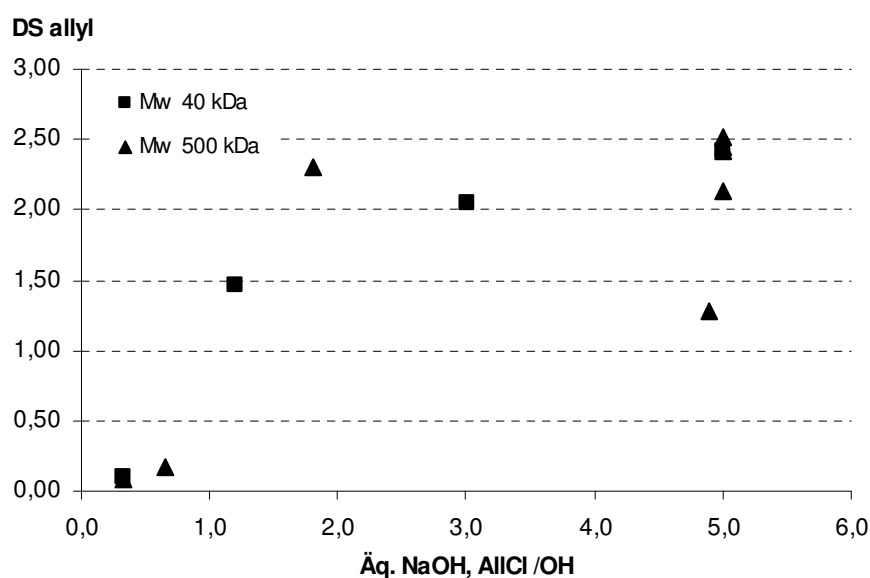


Abb. 6-10 Allyl-DS-Werte in Abhängigkeit von den Äquivalenten NaOH am Beispiel von Allyldextranen mit $M_w = 40$ und 500 kDa und AIBr als Reagenz.

Bei der Verwendung von NaOH als Base streut der erreichte DS in Abhängigkeit von den Äquivalenten zum Teil in einem weiten Bereich (siehe Abb. 6-10). Bei dieser heterogenen Reaktion wird die NaOH fein gemörsert als Feststoff zu der DMSO-Dextran-Lösung gegeben. Da die Deprotonierung nur an der Kontaktfläche zwischen NaOH und Dextran erfolgt, ist die Größe der Oberfläche und damit der Grad der Körnung sehr wichtig. Diese lässt sich bei verschiedenen Versuchsansätzen jedoch nicht genau reproduzieren, weshalb es auch bei gleichen „Äquivalenten“ zu unterschiedlicher Basenwirksamkeit kommt. Zudem kann auf der NaOH-Oberfläche adsorbierte Feuchtigkeit die Reaktionseffizienz beeinflussen. Daher unterliegt der zwar generell ansteigende Trend des DS bei NaOH als Base Schwankungen.

Das Monomermuster der Allyldextrane M_w 500 kDa (siehe Abb. 6-11) zeigen sehr große Anteile an 2,3,4-Allyl aber dennoch signifikante Mengen an unsubstituierter AGU (v.a. AV 163, 122, 125). Dieses entspricht der für „NaOH-Proben“ typischen Heterogenität der Produkte, die ebenfalls auf die Grenzflächenreaktion adsorbierter Polymermoleküle zurückzuführen ist und von Heinze^[223] und Mischnick^[207] untersucht wurden. Mit zunehmenden NaOH-Äquivalenten nehmen die relativen Anteile der un- und mono- zu Gunsten der di- und trisubstituierten Monomere ab.

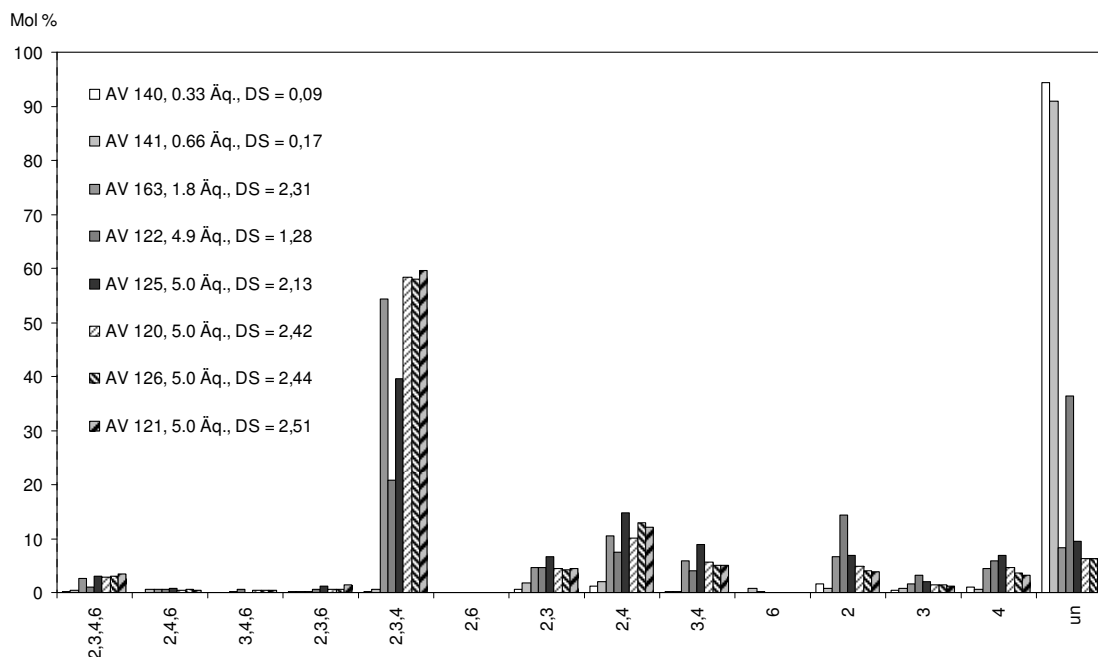


Abb. 6-11 Monomermuster von Allyldextranen M_w 500 kDa, die mit zunehmenden Äquivalenten an NaOH und AlCl₃ pro OH-Gruppe synthetisiert wurden.

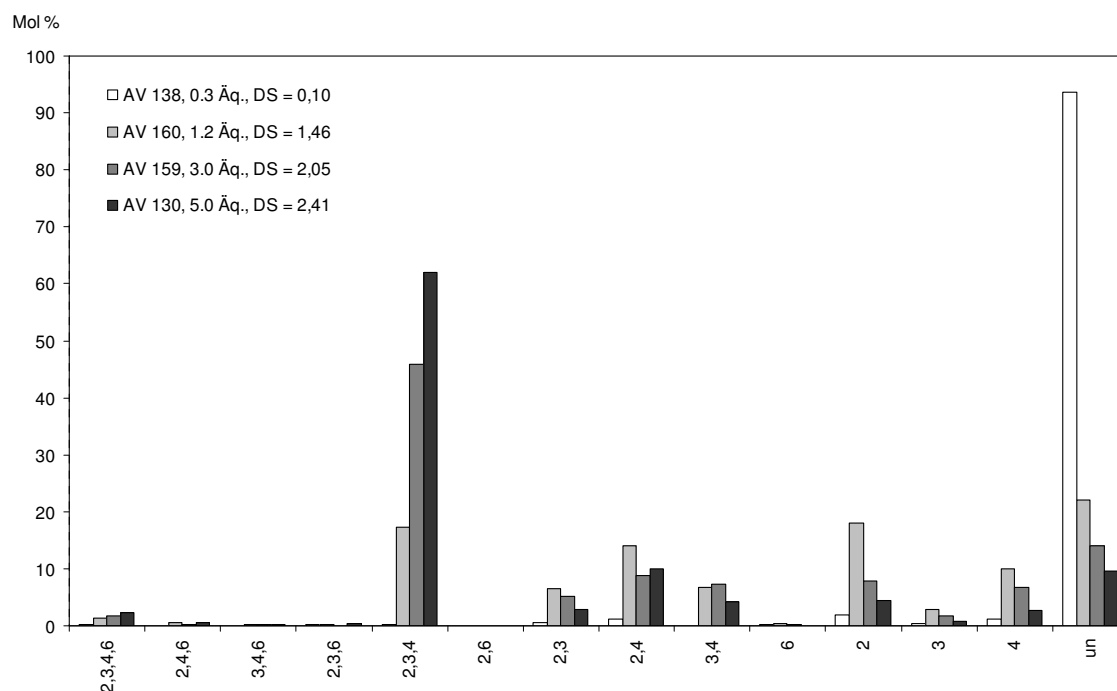


Abb. 6-12 Monomermuster von Allyldextranen **M_w 40 kDa**, die mit **zunehmenden Äquivalenten an NaOH** und AlCl pro OH-Gruppe synthetisiert wurden.

Auch die Monomermuster der Allyldextrane M_w 40 kDa (siehe Abb. 6-12) zeigen die bereits beschriebenen heterogenen Charakteristika. Mit steigender NaOH-Menge sinken auch hier die relativen Anteile von un-, mono- und di- zugunsten der hochsubstituierten 2,3,4-Tri-*O*-allyl-glucose.

Bei Verwendung eines sehr großen Überschusses an NaOH (5 Äq./OH) befindet man sich im Bereich von Perallylierungsbedingungen und erhält vergleichbare Allyldextrane mit einem DS_{Allyl} von 2,5 und nahezu identischen Monomermustern (siehe AV 120, 121, 126, Abb. 6-11).

6.1.2.5.3 Einfluss der Äquivalente an Li-Dimsyl und Allylhalogenid

Um den Einfluss der Menge an Li-Dimsyl und Allylhalogenid (jeweils in äquimolarem Verhältnis eingesetzt) zu untersuchen, wurde Dextran M_w 500 kDa mit 0,75 - 1,0 - 1,5 und 2,5 Äquivalenten pro OH-Gruppe in DMSO bei Raumtemperatur umgesetzt (siehe Abb. 6-13).

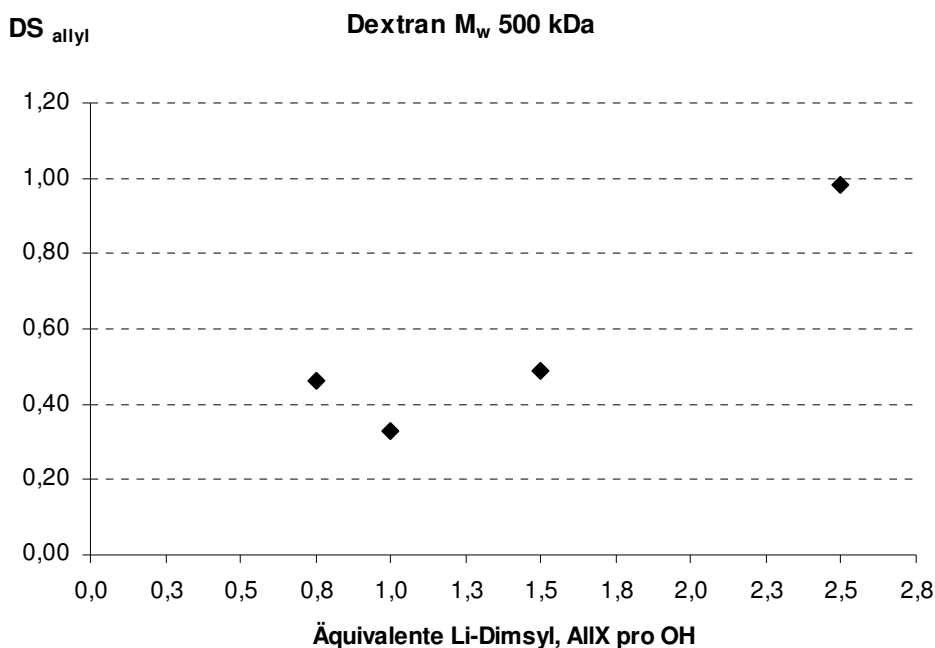


Abb. 6-13 Abhängigkeit des Allyl-DS-Wertes von den Äquivalenten an Li-Dimsyl am Beispiel von Allyldextranen mit $M_w = 500$ kDa und variierenden AllX (Br, Cl).

Bei 1,0 bis 2,5 Äquivalenten pro OH-Gruppe nimmt mit steigender Menge an Li-Dimsyl und Allylhalogenid (Br, Cl) pro OH auch der Allyl-DS zu. Lediglich der DS-Wert bei Verwendung von 0,75 Äquivalenten weicht mit 0,46 nach oben ab. Mit zunehmenden Äquivalenten wird also in der Regel ein höherer DS erreicht. Jedoch stehen nicht ausreichend vergleichbare Ansätze zur Verfügung, um den gesamten DS-Bereich von 0 bis 3 abdecken zu können. Hier wären weitere Versuchsreihen erforderlich, um die DS-Entwicklung genauer beurteilen zu können. Dessen ungeachtet ist bereits ersichtlich, dass trotz des homogenen Li-Dimsyl-Systems kein typischer, degressiver Verlauf mit asymptotischer Annäherung des DS-Wertes an 3,0 beobachtet wird. Studien an Methyl-dextranen gehen diesem Phänomen weiter nach (siehe hierzu auch Kapitel 7).

Das Monomermuster von AV 172 (0,75 Äquivalente Dimsyl) weist im Vergleich zu den Ansätzen mit höheren Basenmengen einen relativ größeren Anteil an 2- und 4-Substitution und geringere Mol-% an unsubstituierter AGU auf, als es den Trends aus AV 30, 31 und 133 folgend entspräche (Abb. 6-14). Da diese Versuchsansätze nicht parallel durchgeführt wurden, ist die Aussagekraft des Vergleiches begrenzt. Das Monomermuster von AV 172 ähnelt hingegen stark dem des parallel angesetzten Allyldextrans AV 171 geringeren

Molekulargewichts, das ebenfalls mit 0.75 Äquivalenten Li-Dimsyl und AlCl₃ synthetisiert wurde (siehe Kapitel 6.1.2.5.1, Abb. 6-8).

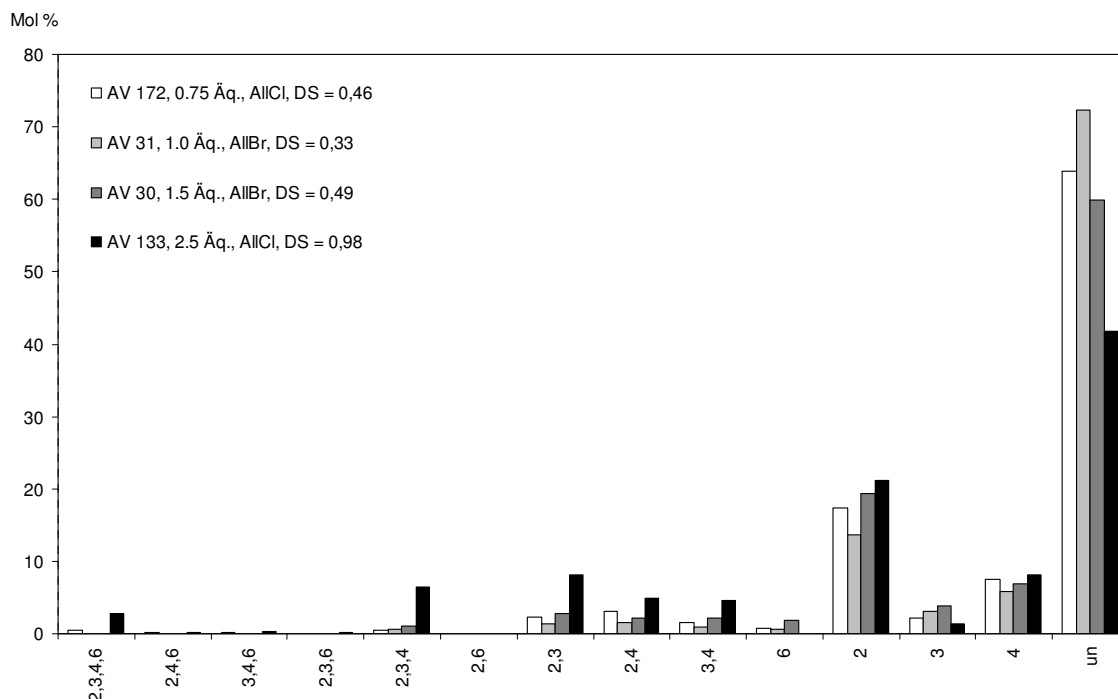


Abb. 6-14 Monomermuster von Allyldextranen mit steigenden Äquivalenten Li-Dimsyl/OH am Beispiel von Allyldextranen mit $M_w = 500$ kDa und variierenden AllX (Br, Cl).

6.1.2.5.4 Einfluss der Reaktionstemperatur

Die Allylierungsreaktionen wurden zumeist bei Raumtemperatur durchgeführt. Einige Ansätze wurden bei 30-35 °C (Siedepunkte: AlCl₃ 45 °C, AlBr 70 °C) durchgeführt. Bei vergleichbaren Äquivalenten an NaOH und AlCl₃ (5,0 pro OH-Gruppe) wurden hierbei auch ähnliche DS-Werte erhalten. Dabei war es egal, ob zwei Tage bei Raumtemperatur (AV 126, DS 2,44) oder drei Tage bei 35 °C (AV 120, DS 2,42) gerührt wurde. Eine Erhöhung der Temperatur hatte somit keinen Einfluss auf den DS-Wert. Auch traten optisch bewertet (Bräunungsgrad) unter Erhitzen nicht mehr Nebenprodukte auf: Bei beiden Allyldextranen handelte es sich um beige-weiße, krümelige Substanzen. Auch im zugehörigen Monomermuster (siehe Abb. 6-15) zeigt sich kein temperaturabhängiger Trend.

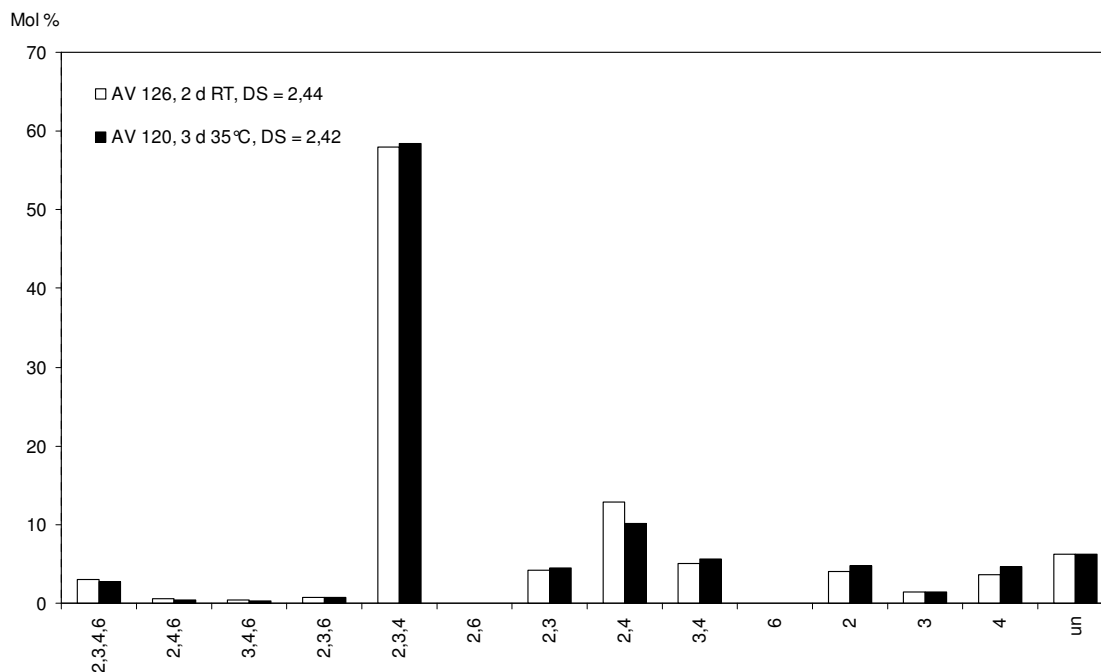


Abb. 6-15 Monomermuster von Allyldextranen, die unter sonst vergleichbaren Bedingungen (M_w 500 kDa, 5,0 Äq./OH NaOH, AlCl₃) bei **verschiedenen Temperaturen** (AV 126 RT, AV 120 35°C) synthetisiert wurden.

6.1.2.5.5 Zusatz von Antioxidantien und Lichtausschluss

Die synthetisierten Allyldextrane sind nach der Gefriertrocknung morphologisch betrachtet in der Regel pulverige oder „fluffige“ weiße bis beige Feststoffe. Bei Exposition an Luft bildet sich teilweise eine härtere Oberfläche aus, so dass ein „Körper“ in Form des Aufbewahrungsbehältnisses entsteht. Von dieser Beobachtung berichten auch Nichols *et al.* bei Allylstärken, welche nur in Lösung stabil waren^[84]. Das Material wird mit der Zeit mehr und mehr unlöslich in sämtlichen gängigen organischen Lösemitteln. Diese Eigenschaft bereitet große Schwierigkeiten bei der strukturellen Charakterisierung und vor allem der weiteren Funktionalisierung der Allylgruppen. Als Ursache wird eine Autopolymerisation der Allylreste vermutet, welche durch Radikale (Luftsauerstoff oder Licht) initiiert werden kann und zur Vernetzung der Derivate führt (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.2 und 6.3). Daher wurde versucht, durch Zusatz von Antioxidantien und/oder Lichtausschluss während verschiedener Stufen der Synthese und Aufarbeitung die Löslichkeit der Allyldextrane in organischen Lösungsmitteln zu erreichen. Die resultierenden Produkte wurden in einer Konzentration von 1 mg/mL in Lösungsmitteln verschiedener Polarität und Eigenschaften (protisch, aprotisch, mit Zusatz des Wasserstoff-

brückenbrechers LiCl) bei Raumtemperatur oder bei erhöhter Temperatur (50-80 °C) für mindestens zwei Tage inkubiert und ihr Verhalten optisch bewertet (siehe Tab. 6-3).

Die Allyldextrane AV 120, 123-125 wurden unter Lichtausschluss synthetisiert. AV 120 und 124 wurden zusätzlich auch unter Lichtausschluss dialysiert und gefriergetrocknet. Keine dieser Maßnahmen führte zu einer guten Löslichkeit der Dextrane in den getesteten Lösungsmitteln. Ein Lichtausschluss verhindert somit nicht die Reaktion der Allylsubstituenten.

Alternativ wurde der Zusatz des Antioxidans (AOX) Hydrochinon als Radikalfänger während der Reaktion, nach einem Tag Reaktionszeit und während der Gefriertrocknung untersucht. Die Kombination aus dessen Zusatz nach einem Tag Reaktionszeit und während der Gefriertrocknung brachte hierbei eine Verbesserung der Löslichkeit (AV 126, 130-134). Besonders die hochsubstituierten Allyldextrane AV 126, 130, 131 (DS >2,4) zeigten in den aromatischen Lösungsmitteln Toluol und Xylol sowie THF und Dichlormethan gute Löslichkeitseigenschaften. Der Zusatz von Hydrochinon ist somit eine Erfolg versprechende Strategie, um besser zugängliche Derivate für weitere Funktionalisierungen zu erhalten. Für die Lagerung von Alkenylpolysacchariden sollten generell Vorsichtsmaßnahmen zur Verhinderung einer Vernetzung ergriffen werden (Schutzgas, Lichtausschluss, geringe Temperaturen).

Tab. 6-3 Übersicht über die Löslichkeitseigenschaften der Allyldextrane in Abhängigkeit von verschiedenen Reaktionsbedingungen wie Lichtausschluss und Hydrochinonzusatz als AOX.

Allyl-dextran	DS (GC)	CHCl ₃ RT heiß	CH ₂ Cl ₂ RT heiß	DMSO RT heiß	THF RT heiß	Toluol RT heiß	Aceton RT heiß	Xylol RT heiß	n -Pentan RT heiß	H ₂ O RT heiß	MeOH RT heiß	weitere (s.u.)	AOX Zusatz	Licht- ausschluss
AV 5	0,37	-								- ±	-			
AV 6	0,79	-		-						- ±	-			
AV 7	0,81	-								- ±	-			
AV 8	0,60	-								- ±	-			
AV 120	2,42	- -	- -	- -	- -	q ± -		q ± -						a) c) d)
AV 121	2,51	q q	q q	- -	q q	q - q +		q - q +					4) 3)	
AV 122	1,28	q - q	- -	- -	q q	q - q +		q - q +					1) 3)	
AV 123	2,06	- -	- -	- -	- -	- -		- -						b)
AV 124	1,16	- -	- -	- -	- -	- -		- -						a) c) d)
AV 125	2,13	- -	- -	- -	- -	- -		- -						a)
AV 126	2,44	q q	q q	- -	q q	q + q +	- -	q + q	- -				2) 3)	
AV 127	1,92	- -	- -	- q	- -	q q	- -	q	- -					
AV 128	2,01	- -	- -	- -	- -	q -	- -	- -						
AV 130	2,41	- -	± +	- -	± ±	- +	- -	- +	- -				2) 3)	
AV 131	2,25	- -	- +	- -	± +	- +	± +	- +	- -				2) 3)	
AV 132	0,95	- -	- -	± ±	± ±	- -	- -	- -	- -				2) 3)	
AV 133	0,98	- -	- -	± +	- -	- -	- -	- -	- -				2) 3)	
AV 134	1,04	- +	- ±	± +	± ±	- -	- -	- -	- -				2) 3)	
AV 159	2,05		-	±								A) ± B-D) -		
AV 160	1,46		-	±								A) ± B-D) -		

- nicht löslich c ~ 1 mg/mL, mind. 2 d inkubiert
- q quillt auf
- ± etwas löslich
- + löslich
- A) DMF, 80 °C
- B) DMF / LiCl 20 g/L, 50 °C
- C) DMSO / LiCl 20 g/L, 50 °C
- D) CH₂CL₂ / H₂O (1/4, v/v, 12 h intensiv gerührt), 50 °C

- 1) Hydrochinonzusatz während Reaktion
- 2) Hydrochinonzusatz während Reaktion nach 1d Rühren
- 3) Hydrochinonzusatz während Gefriertrocknung
- 4) Hydrochinonzusatz vor AlCl₃ Zugabe
- a) Reaktion in braunem Kolben
- b) Kolben bei Reaktion mit Alufolie umschlossen
- c) Dialyse unter Lichtausschluss (Alufolie)
- d) Gefriertrocknung unter Lichtausschluss (Alufolie)

6.1.2.5.6 *Variation der Aufarbeitung*

Nach Beendigung der Reaktion wurde überschüssiges Allylhalogenid im Hochvakuum entfernt. Die Isolierung der Allyldextrane erfolgte in der Regel mittels Dialyse in Cellulose-Membranen mit Ausschlussgrößen (Molecular Weight Cutt off, MWCO) zwischen 14 kDa (Dextrane M_w 15-25 kDa und größer) und 3,5 kDa (Dextran M_w 6 kDa) gegen Wasser. Hierbei wird das Lösungsmittel DMSO sukzessive in einem Diffusionsprozess gegen Wasser ausgetauscht (Osmose). Der Dialyserückstand wird im Anschluss lyophilisiert. Während der Gefriertrocknung kann es zur Überstrukturbildung der Polysaccharide kommen, was ggf. die physikalischen Eigenschaften der Produkte wie Lösungseigenschaften verändert. Daher wurden als alternative Aufarbeitungen die Polymerfällung sowie die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln untersucht.

Für den Fällversuch (AV 125, DS = 2,13) wurde die DMSO-haltige Reaktionsmischung in kaltes Wasser getropft und über Nacht bei 7 °C gerührt. Der weiße Niederschlag wurde abzentrifugiert und mehrmals mit Wasser gewaschen. Man erhielt eine weiße, sehr harte Substanz, deren Lösungseigenschaften gegenüber den mittels Dialyse isolierten Dextranen noch schlechter waren (vgl. Tab. 6-3). Zudem besteht beim Fällen die Gefahr selektiver Materialverluste (Fraktionierung), z.B. nach Substitutionsgrad oder Substituentenverteilung auf einzelnen Polymersträngen, so dass diese Alternative verworfen wurde.

Bei der Extraktion der Allyldextrane mit Dichlormethan trat starke Emulsionsbildung auf, so dass sich keine Phasenseparation einstellte und diese alternative Methode ebenfalls verworfen wurde. Auch hier besteht die Gefahr selektiver Verluste durch Fraktionierung, so dass eine Extraktion nur für sehr hoch allylierte Derivate in Frage kommt.

Die Dialyse und Gefriertrocknung bleibt demnach für Allyldextrane trotz möglicher Strukturveränderungen die Isolierungsmethode der Wahl.

6.1.2.5.7 *Reinigung von Allyldextranen durch Soxhlet-Extraktion*

Etwa 200 mg der Allyldextrane AV 159 (DS = 2,05) und AV 160 (DS = 1,46), beide M_w 40 kDa und mit NaOH in DMSO synthetisiert, wurden 52 h lang mit Dichlormethan in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden im Vakuum zur Trockene eingeengt und gravimetrisch bestimmt. Die klaren und klebrigen Filme (9,6 %

AV 159 bzw. 7,8 % AV 160) wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -, ATR-IR-Spektroskopie und EA untersucht. Die Rückstände wurden zum Vergleich mit den Proben vor Extraktion ebenfalls auf ihre elementare Zusammensetzung analysiert sowie davon Infrarotspektren aufgenommen. Die Massen-Wiederfindung lag insgesamt bei 101 % (AV 159) bzw. 95 % (AV 160).

Die Extraktausbeute ist bei AV 159, bei welchem 3,0 Äquivalente/OH Allylchlorid zur Synthese eingesetzt wurden, mit 9,6 % höher als bei AV 160 (7,8 %), bei welchem nur 1,2 Äquivalente/OH AlCl_3 verwendet wurden. Dieses spricht für Verunreinigungen der Allyldextrane, die aus Nebenprodukten des Allylhalogenids resultieren. Je mehr Allylierungsreagenz eingesetzt wird, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit und Menge von Neben- oder Abbauprodukten wie Diallylether, Allylalkohol und Folgeprodukten hieraus.

Der nach Soxhlet-Extraktion aus dem C/H-Verhältnis berechnete DS-Wert stimmt mit 2,2 bei AV 159 besser mit den GC-Werten (2,05) überein als vor der Soxhlet-Extraktion (> 3 , siehe Tab. 6-4). Bei AV 160 ($\text{DS}_{\text{GC}} = 1,46$) war der aus den EA-Daten errechnete DS vor Extraktion mit 1,4 etwas niedriger als nach Soxhletbehandlung (1,6). Bei beiden Proben liegen die aus dem C/H-Verhältnis nach Extraktion erhaltenen Allyl-DS-Werte um 0,15 höher als die mittels GC bestimmten Substitutionsgrade. Die Standardabweichungen der Elementaranalyse liegen jedoch beim C/H-Verhältnis bei $\pm 0,05$, was in einer Unsicherheit der DS-Bestimmung von $\pm 0,2$ resultiert. Die mittels EA ermittelten DS-Werte nach Extraktion liegen somit unter Berücksichtigung des Fehlers im Bereich der GC-Werte.

Der Vergleich der ATR-IR-Spektren (siehe Abb. 6-16) zeigt eine Abnahme der OH-Valenzschwingungen des Allyldextrans nach Dichlormethan-Extraktion. Der Extrakt selbst weist nahezu keine OH-Schwingungen auf, weshalb Allylalkohol als dessen Bestandteil eher unwahrscheinlich ist. Hier wurde offensichtlich unter anderem auch Rest-Feuchtigkeit aus dem Allyldextran-Rohprodukt entfernt. Die Intensität der (C-H)-Valenzschwingungen um 2920 cm^{-1} im Extrakt ist relativ gestiegen, ebenso die der (C-H)-Deformationsschwingungen bei 1446 cm^{-1} . Die schwache Allylbande um 1643 cm^{-1} ist in ihrer Intensität im Vergleich mit dem Ausgangsprodukt nahezu unverändert. Absorptionen des Extraktes im Bereich 1278 sowie 1008 und 1076 cm^{-1} deuten auf (C-O-C)-Etherschwingungen, wie sie auch in Diallylether auftreten würden. Die Schwingungen des

Extrakt im ATR-IR-Spektrum können jedoch auch durch die (Mit-)Extraktion von hochsubstituiertem Allyldextran erklärt werden.

Tab. 6-4 Vergleich der elementaranalytisch bestimmten DS-Werte von Allyldextranen vor und nach 52 h Soxhlet-Extraktion mit Dichlormethan sowie die Ergebnisse der Elementaranalyse der Extrakte.

	AV 159			AV 160		
	vor Soxhlet		Extrakt	vor Soxhlet		Extrakt
Massenanteil [%]	91,1		9,6	87,2		7,8
WDF [%]			100,7			95,0
w % C *	58,7	56,3	55,8	52,0	57,1	58,1
entsprechender DS	1,9	1,4	1,4	0,8	1,6	1,7
w % H *	7,1	7,1	7,7	6,7	7,3	7,8
entsprechender DS	1,3	1,1	2,6	0,6	1,5	1,6
C/H	8,2	8,0	7,2	7,8	7,9	7,4
entsprechender DS	> 3,0	2,2	0,2	1,4	1,6	0,5
DS (GC) Rohprodukt	2,05			1,46		

Soxhlet Extraktion 52 h mit Dichlormethan

WDF = Wiederfindung (Gewichts-%)

* = Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen (n = 2-3)

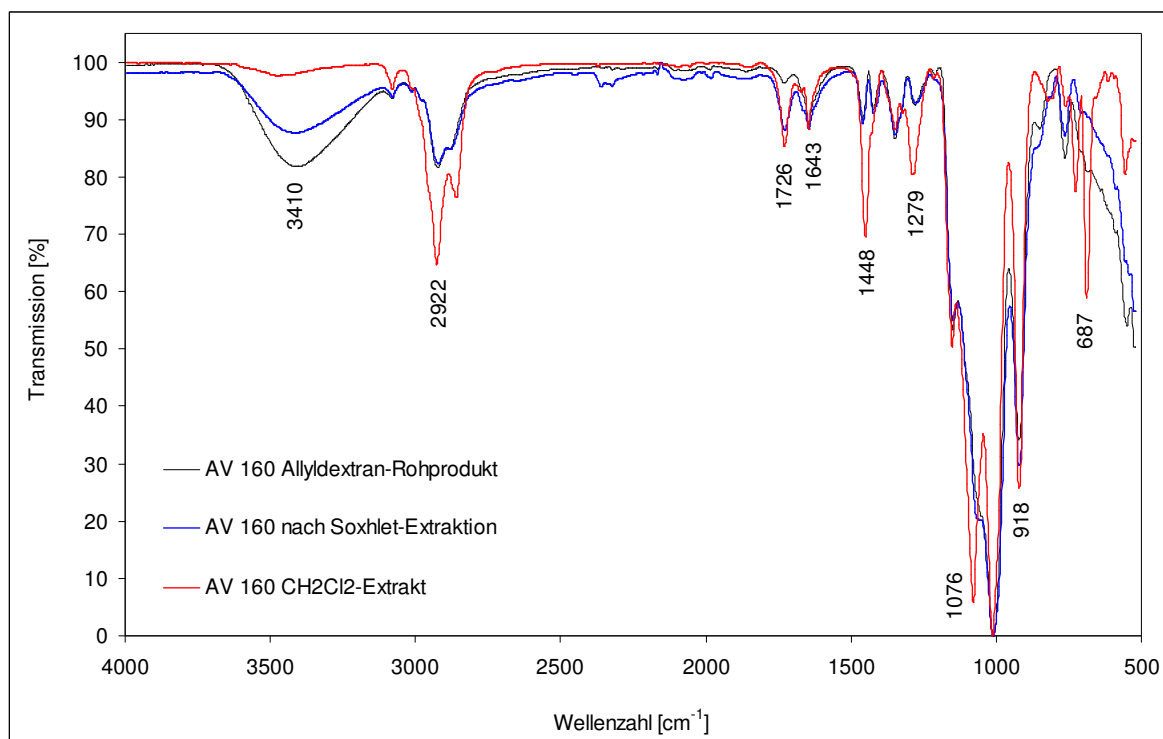


Abb. 6-16 Vergleich der ATR-IR Spektren am Beispiel von AV 160 (DS = 1,46) vor und nach Dichlormethan Extraktion sowie des Dichlormethan-Extraktes selbst.

Die ^1H -NMR-Spektren der Extrakte zeigen deutliche Resonanzen in dem für Allyldextrane charakteristischen Bereich zwischen 3,0 und 5,9 ppm (siehe Abb. 6-17). Dieses spricht erneut für eine Extraktion von hochsubstituiertem Allyldextran, so dass eine Identifizierung von Nebenprodukten schwierig ist. Multipletts im Bereich 1-2 ppm deuten auf länger-kettige Alkylgruppen, welche z.B. durch Autopolymerisation von Nebenprodukten entstanden sein könnten. Das Verhältnis der Allyldextran-Protonen zu den Protonen des Nebenproduktes beträgt etwa 1,5 zu 1. Aus dem Verhältnis des Signales bei 5,95 ppm ($\text{C}=\text{CH}$) zu H-1 kann nach Gl. (1) der Allyl-DS des aus AV 160 ($\text{DS} = 1,46$) extrahierten Allyldextrans auf 2,8 abgeschätzt werden. Durch die Soxhlet-Extraktion werden demzufolge hochsubstituierte Bestandteile isoliert, wodurch eine in diesem Fall unerwünschte Fraktionierung des Materials stattfindet.

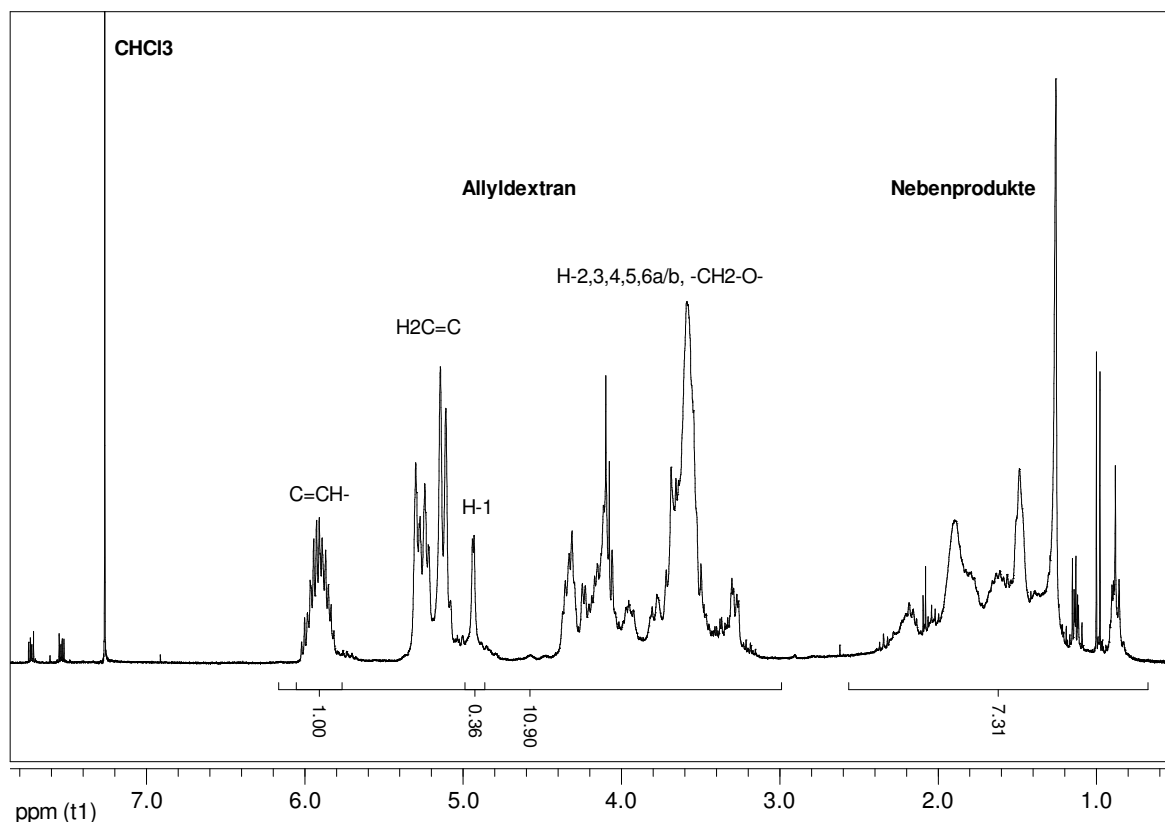


Abb. 6-17 ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 300 MHz) des Dichlormethanextraktes von Allyldextran AV 160 ($\text{DS} = 1,46$) nach 52 h Soxhlet-Extraktion.

Es bleibt festzuhalten, dass sich mit einer Dichlormethanextraktion aus bereits dialysierten Allyldextranen noch relativ hochmolekulare, unpolare und/oder stark adsorbierte Verunreinigungen herauswaschen lassen. Jedoch kann eine Mitextraktion von relevanten

Probenbestandteilen des Allyldextrans und damit eine unerwünschte Fraktionierung des Materials gerade bei hoch substituierten Dextranen nicht verhindert werden.

6.1.2.6 Vergleich der Substitutionsmuster mit statistischen Modellen

Bereits 1939 entwickelte Spurlin^[224] ein statistisches Modell, nach welchem die Verteilung der Substituenten in der Glucose basierend auf den unterschiedlichen Reaktivitäten der Hydroxylgruppen der Cellulose berechnet werden kann. Angelehnt an dieses Modell wurden die analysierten Monomermuster der Dextranderivate mit einem „Random-Modell“ verglichen. Hierzu wurden folgende vereinfachende Annahmen gemacht:

- die Reaktion verläuft nach einer Kinetik erster Ordnung
- alle AGUs sind während der Derivatisierung in gleicher Weise zugänglich
- Endgruppen und verzweigte Glucosen können aufgrund ihres geringen Anteils vernachlässigt werden
- die Reaktionskonstanten k_2 , k_3 , k_4 bleiben relativ zueinander während der Reaktion unverändert
- Substitution an einer Position hat keinen Einfluss auf die Reaktivität der verbliebenen OH-Gruppen

Wenn die partiellen DS Werte für die Positionen 2, 3 und 4 (6 wird außer Acht gelassen) aus der gaschromatographischen Analyse bekannt sind, kann das zu erwartende statistische Muster innerhalb der AGU anhand dieses Modells berechnet werden. Der Vergleich der experimentellen mit den berechneten Werten kann ein abweichendes Verhalten vom Modell und so einen möglichen Einfluss von Erst- auf die Folgesubstitution aufzeigen. Der Heterogenitätsparameter H_I wird dabei als Maß für die durchschnittliche Abweichung vom berechneten statistischen Muster herangezogen. Er ist definiert als:

$$H_I = \sqrt{\sum_{i=0}^{234} \Delta s_i^2} \quad (I)$$

mit $\Delta = s_i$ (experimentell) – s_i (Modell) und s_i = Molenbruch der AGUs mit Substitution in Position i .^[208]

Für kommerziell erhältliche Methylcellulosen oder homogen hergestellte Amyloseether liegt H_I in der Regel bei Werten ≤ 3 , was als statistische bis schwach heterogene

Verteilung der Substituenten betrachtet werden kann. Allerdings muss H_I immer in Abhängigkeit des Substitutionsgrades bewertet werden, da die mögliche Abweichung bei sehr tiefen und sehr hohen DS-Werten naturgemäß geringer ist.

Bei den Allyldextranen wurden 6-*O*-Allylether der Kettenenden zu den korrespondierenden 6-OH-Derivaten summiert, z.B. 2,6-Di-*O*-allyl zu 2-*O*-Allyl, um die 6-Substitution am Kettenende zu vernachlässigen. Die erhaltene Abweichung zwischen dem Random-Modell und den experimentell ermittelten Daten ist in Abb. 6-18 ff. gezeigt: links: Abweichung der einzelnen Monomere vom Modell, rechts: Abweichung von un- (c_0), mono- (c_1), di- (c_2) und tri- (c_3) substituierten Fraktionen vom statistischen Modell.

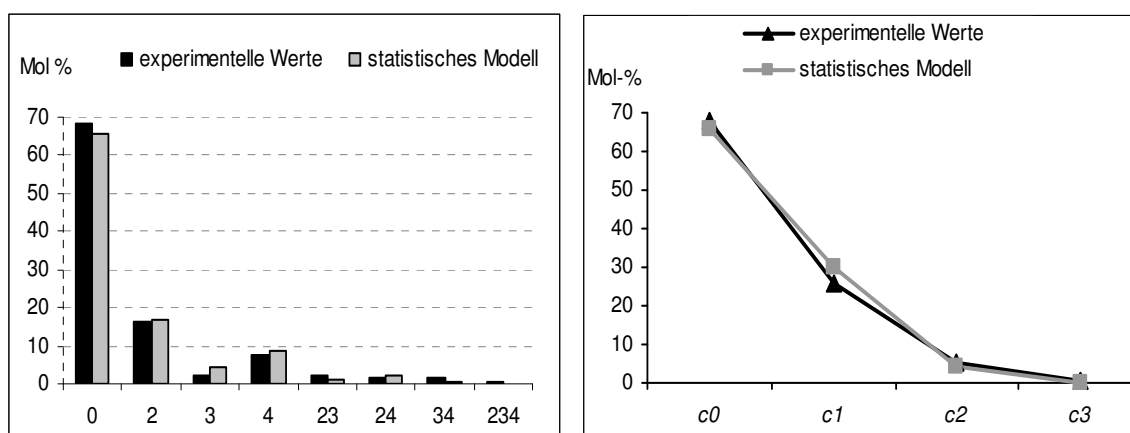


Abb. 6-18 AV 23 D, Allyldextran M_w 500 kDa, $1.1 \text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}/\text{OH NaOH}$, AllBr, DS 0.40, $H_I = 3.9$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituerter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

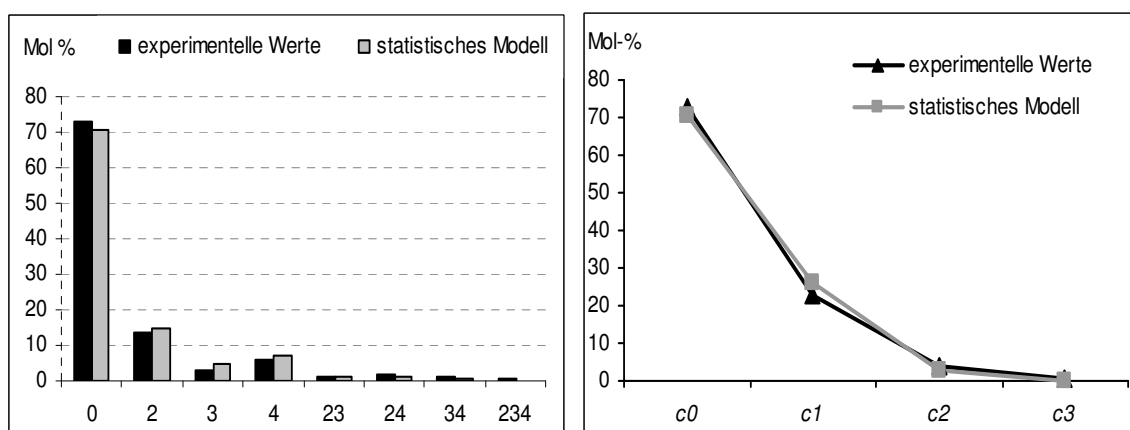


Abb. 6-19 AV 31, Allyldextran M_w 40 kDa, $1.0 \text{ } \ddot{\text{A}}\text{q.}/\text{OH Li-Dimsyl}$, AllBr, DS 0.33, $H_I = 3.1$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituerter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

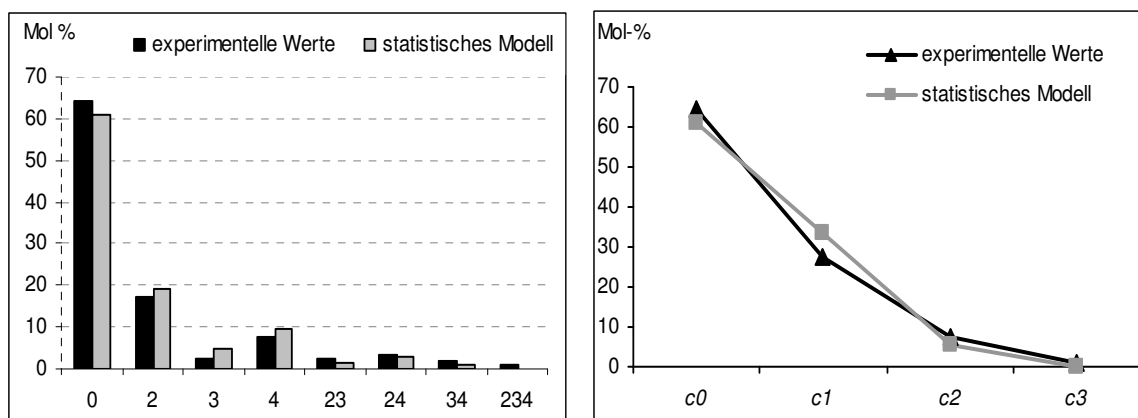


Abb. 6-20 AV 172, Allyldextran M_w 500 kDa, **0.75 Äq./OH Li-Dimsyl**, AlCl_3 , **DS 0.46**, $H_1 = 5.3$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituierter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

Bei geringen Basenmengen und AllX Äquivalenten von 0.75 bis 1.1 pro OH und niedrigen DS-Werten (0,33 bis 0,46) zeigt sich eine eher statistische Verteilung der Substituenten (siehe Abb. 6-18 bis Abb. 6-20).

Bei den übrigen Allyldextranen weicht das Verhältnis der un- (c_0), mono- (c_1), di- (c_2) und trisubstituierten (c_3) Glucoseeinheiten stärker vom statistisch zu erwartenden Verhältnis mit den genannten einschränkenden Bedingungen ab (siehe Abb. 6-21 bis Abb. 6-23). Während c_0 und c_3 positiv abweichen, sind c_1 und/oder c_2 erniedrigt. Während 3-*O*-Allylglucose bei den monosubstituierten Bausteinen am stärksten abweicht, ist die Erniedrigung der entsprechenden 2,3- und 3,4-Di-*O*-allylglucosen im Vergleich zu 2,4-Di-*O*-allylglucose weniger ausgeprägt. Möglicherweise reagiert 3-*O*-Allylglucose schneller zu den entsprechend höher substituierten Glucosen (2,3 / 3,4; 2,3,4) weiter. Die Heterogenität H_1 ist bei allen diesen Derivaten sehr hoch (> 16 bis 27). Eine mehrstufige Reaktionsführung mit NaOH (siehe AV124, Abb. 6-21) brachte keine signifikante Änderung bei der Abweichung vom statistischen Modell mit sich (vgl. AV 122, Abb. 6-22).

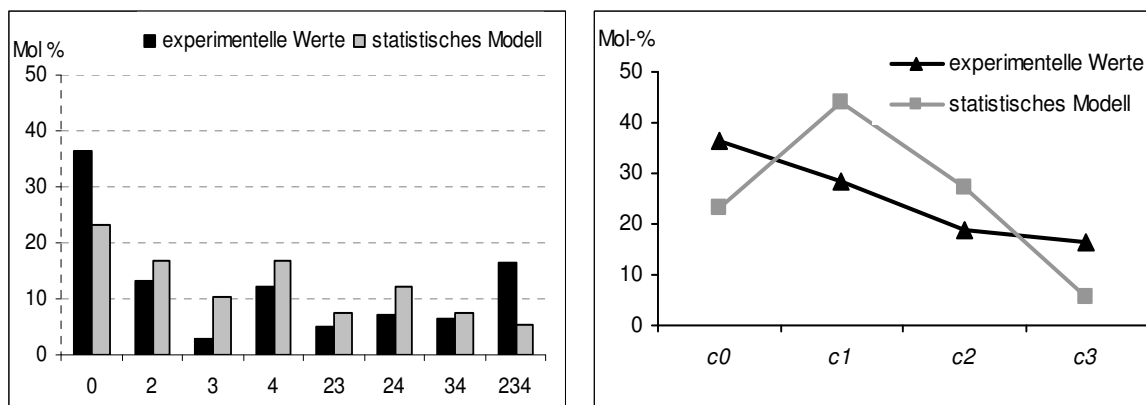


Abb. 6-21 AV 124, Allyldextran M_w 500 kDa, 3×5.0 Äq./OH NaOH, AlCl₃, DS 1.16, $H_1 = 20.6$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituierter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

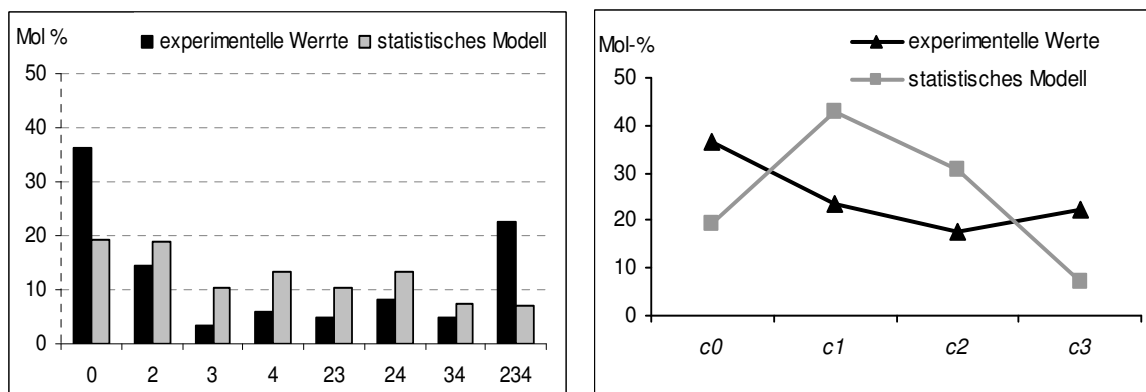


Abb. 6-22 AV 122, Allyldextran M_w 500 kDa, 1×4.9 Äq./OH NaOH, AlCl₃, DS 1.28, $H_1 = 26.9$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituierter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

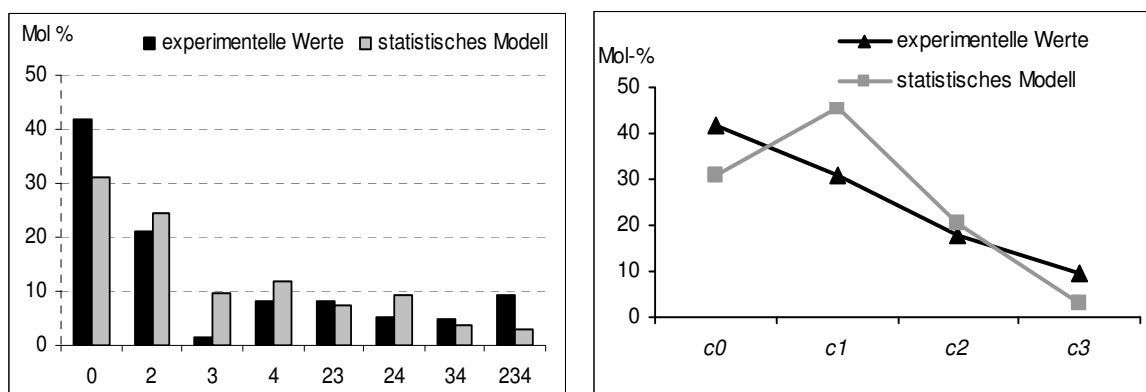


Abb. 6-23 AV 133, Allyldextran M_w 500 kDa, 1×2.5 Äq./OH Li-Dimsyl, AlCl₃, DS 0.98, $H_1 = 16.3$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituierter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

Eine hohe Heterogenität H_I kann bedeuten, dass die Reaktivität einer Glucosyleinheit durch Erstsitution erhöht wird und dies in unspezifischer Weise, so dass auch die dritte Substitution schneller erfolgt als in einem unsubstituierten Rest. Ist dieses „Nachziehen“ von Allylresten ein lokaler Effekt (z. B. durch Erhöhung der lokalen Reagenzkonzentration durch Assoziation, Präpositionierung o. ä.), ist anzunehmen, dass er nicht auf die Glucoseeinheit beschränkt bleibt, sondern auch zu lokal erhöhten Substituentendichten im Makromolekül führt. Eine Abweichung vom statistischen Modell kann aber auch resultieren, wenn im Material eine hohe Heterogenität auftritt, d.h. Teile – z. B. infolge besseren Lösungszustandes - besser zugänglich sind und schneller reagiert haben als andere.

Während die beobachtete Abweichung vom Modell für Umsetzungen in DMSO mit festem NaOH durchaus typisch und auf die erhöhte Reaktivität der auf den NaOH-Partikeln adsorbierten Polysaccharidmoleküle zurück zu führen ist, wurden bei einer homogenen Umsetzung mit Li-Dimsyl als Base keine derartigen Effekte erwartet. Bei der Allylierung von Dextranen zeigte sich dagegen offenbar kein solch grundlegender Unterschied je nach Wahl der Base, wie aus dem Vergleich von Abb. 6-21 (NaOH, AV 124) und Abb. 6-23 (Li-Dimsyl, AV 133) hervorgeht. Die Dextrane gelierten beim Einsatz von Li-Dimsyl sehr stark, so dass das Allylierungsreagenz ($\text{AlI}Br$ oder $\text{AlI}Cl$) eventuell nicht gleichmäßig im Reaktionsgemisch verteilt wurde. Hieraus könnte die beobachtete Heterogenität auch für dieses System resultieren und damit den Ergebnissen mit NaOH vergleichbar machen.

Ein anderes Erklärungsmodell ist eine mögliche Abschirmung innerer Bereiche aufgrund der Verzweigungsstruktur des Dextrans. Die schnelle Deprotonierung durch Li-Dimsyl könnte zu einem negativ geladenen „Schutzschild“ führen, welcher das weitere Eindringen von Li-Dimsyl-Anionen ins Makromolekül erschwert (siehe Abb. 6-24). Man erhielte Bereiche hoher Substituentendichte (außen) und Bereiche mit sehr geringem Substitutionsgrad (innen). Dieses würde die hohe Abweichung von c_0 und c_3 vom statistischen Modell erklären.

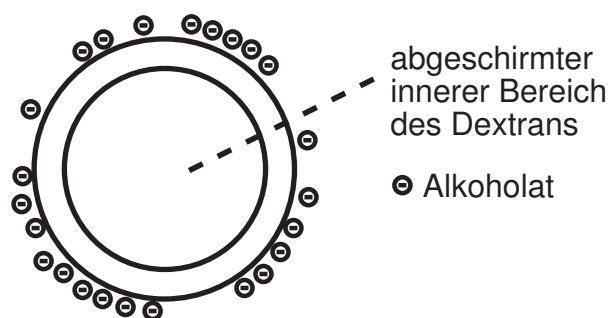
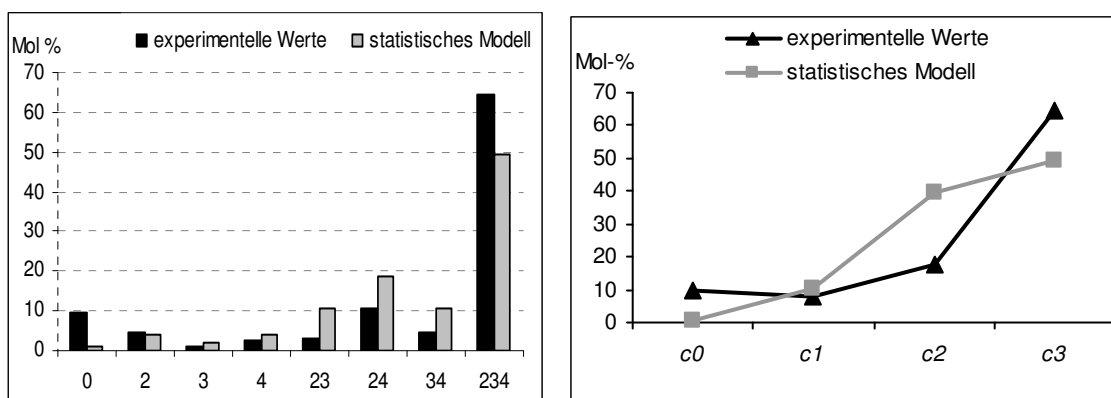
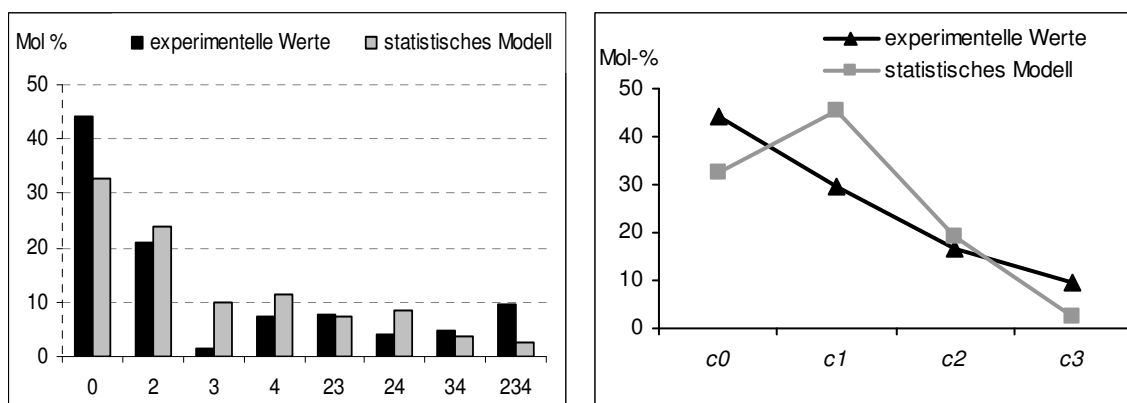


Abb. 6-24 Modell der Abschirmung eines inneren Kernbereiches des Dextrans.

Abb. 6-25 AV 130, Allyldextran M_w 40 kDa, 5.0 Äq./OH NaOH, AlCl₃, DS 2.41, H_1 = 21.7. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituierter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.Abb. 6-26 AV 132, Allyldextran M_w 6 kDa, 2.5 Äq./OH Li-Dimsyl, AlCl₃, DS 0.95, H_1 = 17.5. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituierter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

Die Größe des Dextrans hat jedoch auf die Abweichung zum statistischen Modell keinen Einfluss, wie sich durch Vergleich von Abb. 6-25 (40 kDa) und Abb. 6-26 (6 kDa)

entnehmen lässt. Ein solcher sollte bei dem zuletzt vorgeschlagenen Modell aufgrund des variierenden Oberfläche zu Volumenverhältnisses bei verschiedenen Dextrangrößen und Verzweigungsgraden jedoch vorhanden sein. Die tri- und unsubstituierten Bereiche (c_0 , c_3) weichen in beiden Fällen positiv vom statistischen Modell ab, c_2 und c_1 sind dagegen erniedrigt. Trotz deutlich verschiedener Substitutionsgrade ist dieser Trend mit Ausnahme sehr geringer DS-Werte (s.o.) durchgängig bei allen Allyldextranen zu beobachten.

Aufgrund der unerwarteten Abweichung des Monomermusters vom statistischen Modell bei Verwendung von Li-Dimsyl als Base, wurden grundlegende Untersuchungen an Methyl-dextranen als einfache Modell-Dextranether durchgeführt. Auch hier zeigte sich dieselben Tendenz hoher Heterogenität H_1 (siehe hierzu Abschnitt 7)^[179].

6.1.2.7 Enzymatischer Abbau

Die enzymatisch freisetzbare Glucosemenge ist ein Hinweis auf die Anordnung und Verteilung der unsubstituierten Glucose im Makromolekül. Je länger die unsubstituierten Sequenzen sind, desto mehr Glucose sollte bei vergleichbarem DS freigesetzt werden können (vgl. Abschnitt 5.2, Analytik der Substituentenverteilung entlang der Polymerkette und Abb. 6-27).

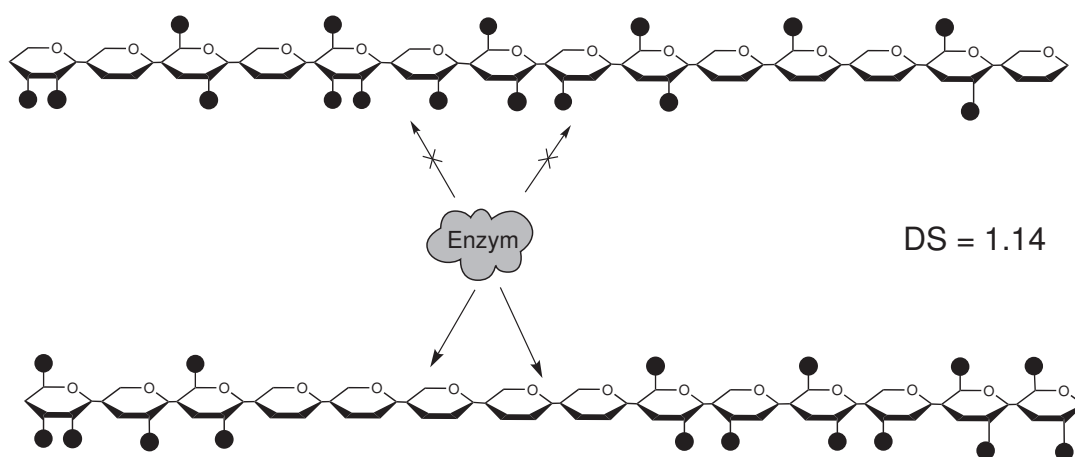


Abb. 6-27 Prinzip des enzymatischen Abbaus und Glucosefreisetzung am Beispiel eines Allyldextran mit einem DS von 1,14.

Die Menge freigesetzter Glucose ist jedoch auch davon abhängig, welche Position der AGU substituiert ist. Für Stärke wurde beobachtet, dass die Hydrolase α -Amylase

6-*O*-CH₃ Substitution stärker toleriert als 2-*O*-CH₃ Substitution^[225]. Vermutlich ist die Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes durch 6-*O*-CH₃ hier weniger gestört. Bei Cellulosen (CMC) wird dagegen eine Carboxymethylgruppe in Position *O*-3 an der -1 Untereinheit toleriert, jedoch verhindert eine Substitution in *O*-2 oder *O*-6 die Hydrolyse durch die Cellulase Cel45A aus *Trichoderma reesei*^[218] (vgl. Abb. 5-3). Beim enzymatischen Abbau von Methacrylat-Dextranen mit Dextranase aus *Penicillium funiculosum* wurden die erhaltenen Produkte mittels ESI-MS charakterisiert^[226]. Sowohl bei nativem Dextran als auch bei Methacrylat-Dextranen (DS 0,04 bis 0,37) zeigte Isomaltose neben Glucose, Isomaltotetraose und -pentaose die höchste Intensität, woraus man allerdings nicht auf die tatsächlichen Mengenverhältnisse schließen kann. Zudem wird keine Aussage zur Identifizierung der Oligomere (z.B. MSⁿ-Fragmentierung) gemacht, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben Isomaltose auch die massengleiche α -(1→3) verknüpfte Nigerosse oder ggf. Maltose detektiert wurden. Mono-methacrylat-substituierte Glucose führte nach Aussage der Autoren zu einer schnelleren Spaltung der Dextrane am reduzierenden Ende.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Allyl- als auch Methyl-dextrane (siehe Kapitel 7.3) verschiedener DS-Werte mit Dextranase aus *Chaetomium erraticum* (E.C. 3.2.1.11) inkubiert. Studien über dieses Enzym hinsichtlich seiner Toleranz gegenüber Substitution liegen nach unseren Erkenntnissen bislang nicht vor.

Da es sich bei Dextranase aus dem Schimmelpilz *Chaetomium erraticum* um ein Glykoprotein handelt^[219], dessen Suspension möglicherweise zusätzlich mit Glucose stabilisiert ist, ist die Bestimmung der Glucose-Ausgangskonzentration in zweifacher Hinsicht unerlässlich. Diese lag in der verwendeten Dextranase-Lösung jedoch sowohl ohne als auch mit Aufkochen der Enzym-Lösung im schwach sauren Citrat-Puffer unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb sowohl ein Glucosezusatz als auch eine Abspaltung von Glucose aus dem Glykoprotein ausgeschlossen werden können. Auch führte das Erhitzen und Aufkochen von Dextran im sauren Milieu ohne Dextranasezusatz nicht zu einer hydrolytischen Spaltung des Dextrans, so dass auch diese Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte.

Zur qualitativen Beurteilung des enzymatischen Abbaus wurde das nach Inkubation aus den nativen Dextranen erhaltene Produktgemisch nach Reduktion und Acetylierung

gaschromatographisch analysiert und mit Standards verglichen. Hierbei zeigte sich, dass neben Glucose ($R_t = 13,6$ min) auch sehr wenig Isomaltose ($R_t = 24,9$ min) sowie Spuren der α -1 \rightarrow 3 verknüpften 3-*O*- α -D-glucopyranosyl-D-glucose (Nigerose, $R_t = 24,5$ min) verblieben waren. α -1 \rightarrow 4 verknüpfte Maltose ($R_t = 24,6$ min) wurde wie erwartet nicht detektiert. Höhere Isomaltooligomere konnten gaschromatographisch nicht erfasst werden (vgl. Abb. 6-28).

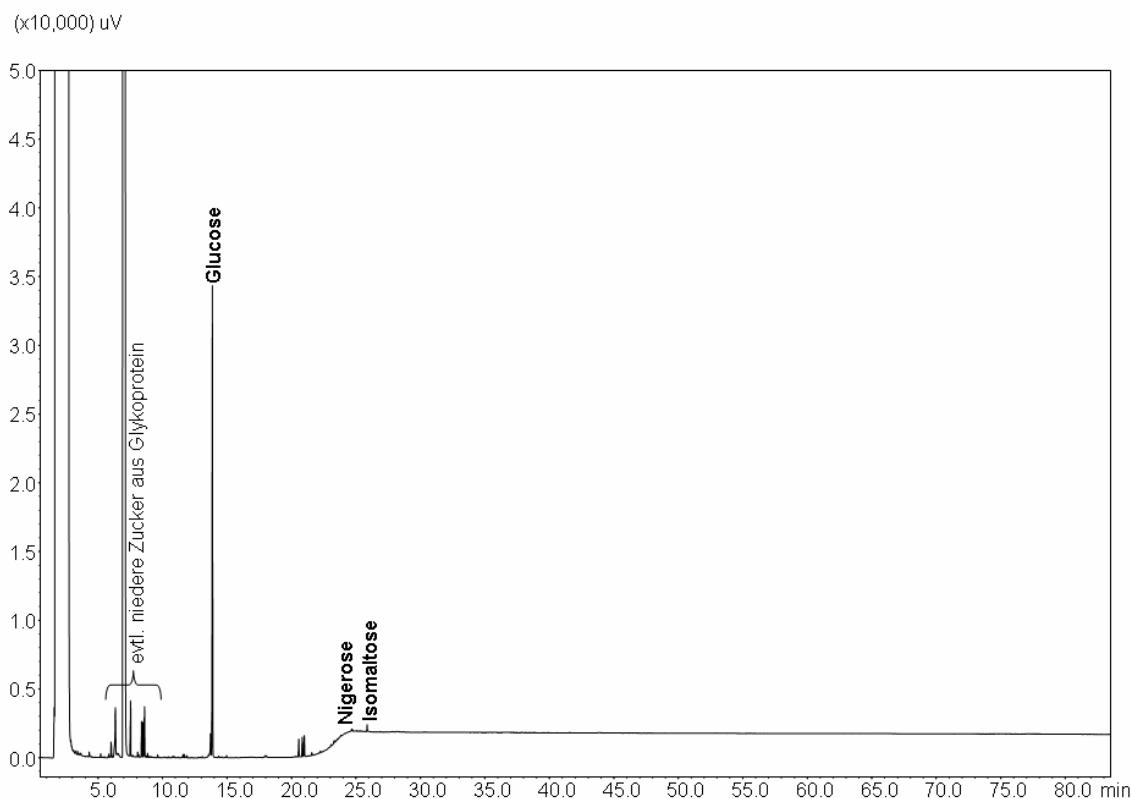
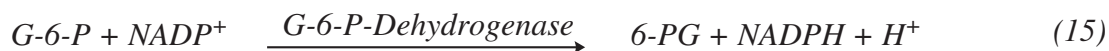


Abb. 6-28 Dextran M_w 500 kDa nach enzymatischem Abbau mit Dextranase aus *Chaetomium erraticum*, Reduktion mit NaBD_4 , Acetylierung, Extraktion mit CH_2Cl_2 , Säule: ZB-5, T-Programm: $60^\circ\text{C}(1')$, $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 200°C , $4^\circ\text{C min}/250^\circ\text{C}$, $20^\circ\text{C min}/310^\circ\text{C}$ ($60'$).



Die freigesetzte Glucose wurde enzymatisch (ENZYTECTM D-Glucose) nach Gleichungen (14) und (15) quantifiziert. Die Bestimmung beruht auf der durch Hexokinase unter

ATP-Verbrauch katalysierte Umsetzung von D-Glucose zu D-Glucose-6-phosphat (G-6-P). Im zweiten Schritt wird diese durch Glucose-6-phosphat-dehydrogenase unter NADP⁺-Reduktion zu D-Gluconat-6-phosphat (6-PG) oxidiert. Die gebildete Menge an NADPH ist der Glucosemenge stöchiometrisch äquivalent und wird bei 340 nm photometrisch bestimmt.

Aus den nativen Dextranen konnten 72-74 % der AGUs als Glucose freigesetzt werden. Den Rest bilden schwerflüchtige, höhere Isomaltoomere, wie durch dünnschicht-chromatographische Untersuchungen der Hydrolysate bestätigt werden konnte. Bei den Dextranderivaten wurde die freigesetzte Menge unsubstituierter Glucose auf die aus der Monomerbestimmung (GC) bekannte enthaltene Menge an unsubstituierter AGU (Mol-% un-, c_0) bezogen.

Für einen typischen Abbau wurden etwa 20 mg Dextran(-derivat) eingesetzt und mit 1,8 mL Citratpuffer pH 5,7 und 186 U Dextranase versetzt. Eine Verdoppelung der Dextranasenmenge auf 372 U führte zu keiner höheren Glucosefreisetzung. Unter sehr langsamem Rühren oder Schwenken wurden die Proben bei 52 °C inkubiert. Nach Denaturierung des Enzyms durch Erhitzen (10 -15 min, 110 °C) und Membranfiltration wurde die freigesetzte Glucosemenge enzymatisch bestimmt. Hierbei zeigte sich bei den nativen Dextranen, dass deren Menge nach 64 h das Maximum von 72-74 % erreicht hatte bzw. nur noch minimal zunahm (Abb. 6-29). Daher wurde diese Zeitspanne für die weiteren Abbauten der Dextranderivate gewählt. Unterschiede in den Lösungseigenschaften im Vergleich zu den unsubstituierten Dextranen können allerdings zu einem langsameren und somit geringeren Abbau in der vorgegebenen Zeit geführt haben. Die Vergleichbarkeit der Dextranderivate untereinander ist davon jedoch nicht berührt.

Bei den untersuchten Allyldextranen sinkt die enzymatische Abbaubarkeit bereits ab einem DS von 0,2 rapide (Abb. 6-30). Unabhängig vom Molekulargewicht ist bei einem DS von etwa 1,0 weniger als 5 % der enthaltenen unsubstituierten Glucose enzymatisch zugänglich. Eine Differenzierung der Heterogenität im Polymermaterial ist daher nur sehr begrenzt möglich.

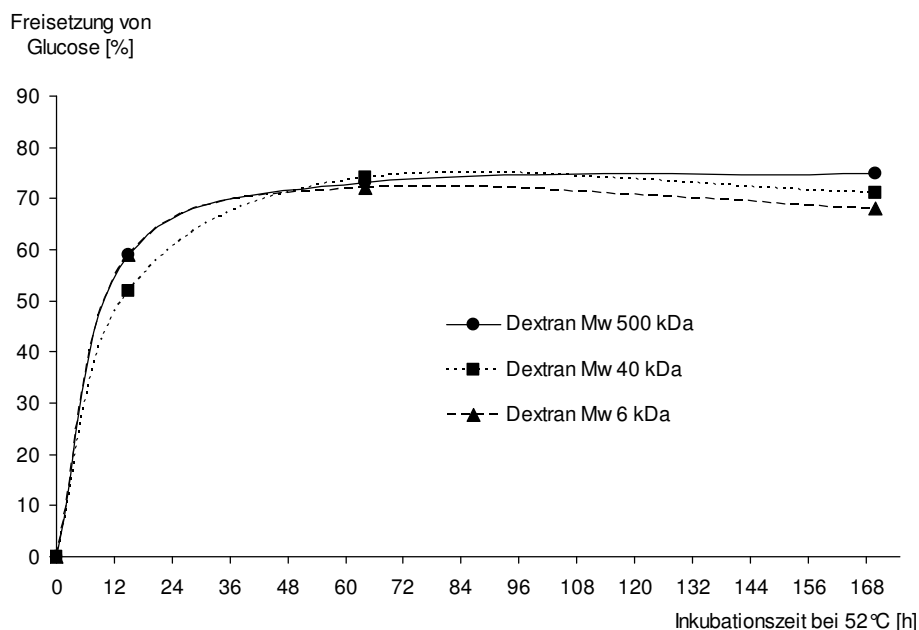


Abb. 6-29 Zeitabhängige Glucosefreisetzung durch Abbau von nativen Dextranen unterschiedlichen Molekulargewichtes mit Dextranase (E.C. 3.2.1.11) aus *Chaetomium erraticum*.

Die Allyldextrane zeigen in wässriger Lösung bei DS-Werten ab etwa 0,5 schlechte bis keine Löslichkeit. Im wässrigen Puffersystem könnte dieses ein limitierender Faktor sein. Jedoch können Fungi-Dextranasen selbst vernetztes und in Wasser unlösliches Sephadex zu Glucose, Isomaltose und höheren Isomaltooligomeren abbauen^[219]. Eine weitere mögliche Erklärung ist die oben erwähnte, möglicherweise bevorzugte Substitution im äußeren, peripheren Bereich des Makromoleküls bzw. seiner Aggregate. Somit würden die innen liegenden, unsubstituierten Bereiche auch gegenüber dem Enzym abgeschirmt sein und nur durch die saure Hydrolyse und Totalabbau freigesetzt werden. Dieses erklärte auch die starke Abweichung der experimentellen Daten einer statistischen Verteilung (siehe Kapitel 6.1.2.6, sehr viel mehr un- und trisubstituierte Bausteine). Jedoch sollte man hierbei bedenken, dass im wässrigen System, d.h. sowohl bei der Dialyse als auch im wässrigen Puffersystem, unsubstituierte und somit polarere Bereiche des Polymers bestrebt sind, sich nach außen zum polaren Medium hin zu orientieren und eine Art Micelle bilden. Dieses Verhalten ist aus der Synthese von Dextran-Nanopartikeln ausgehend von hydrophoben Dextranderivaten bekannt^[24]. Somit sollten die unsubstituierten Bereiche des Dextrans der Theorie nach in wässriger Lösung eher besser zugänglich sein, sofern nicht weitere Parameter wie z.B. die hohe Konzentration an Polysaccharid in der Inkubationslösung und der infolgedessen auftretenden Verknäulung diesem Bestreben entgegenwirken.

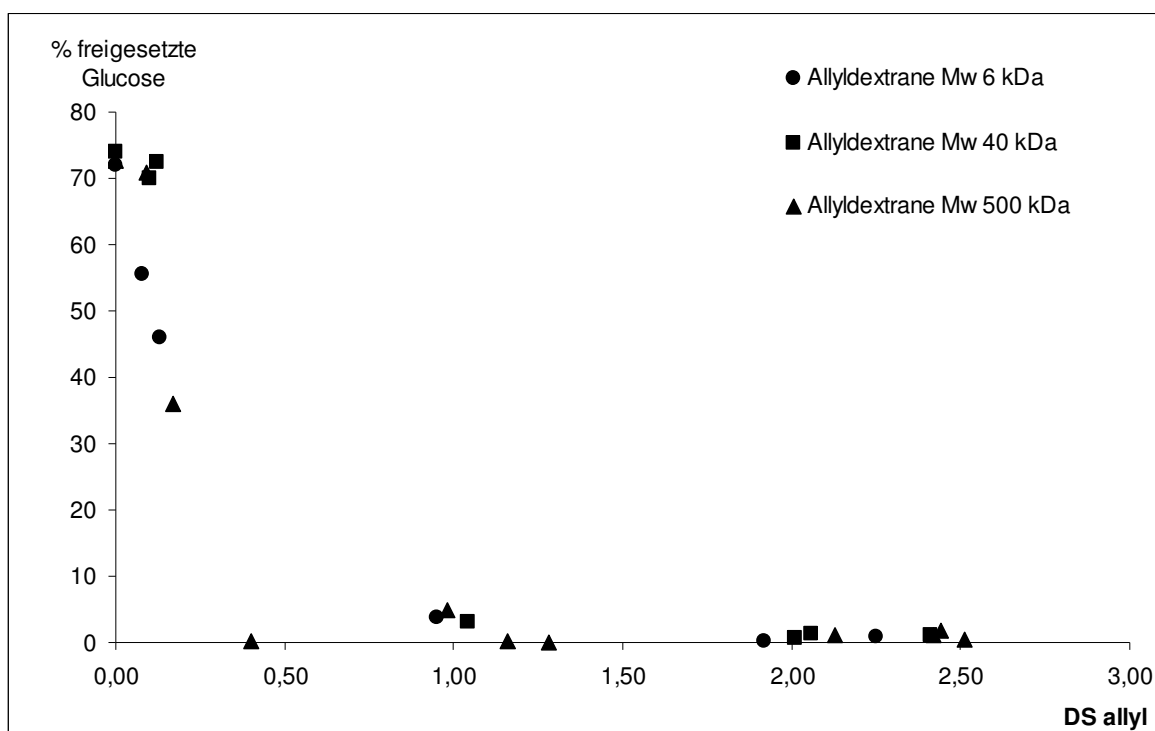


Abb. 6-30 Enzymatisch freigesetzte Glucosemenge (in %, bezogen auf unsubstituierte Glucose aus GC-Analytik) in Abhängigkeit des Allylsubstitutionsgrades für Allyldextrane verschiedener Molekulargewichte. Die Bestimmung der Glucosemenge erfolgte enzymatisch.

Über das aktive Zentrum der verwendeten Dextranase, seine Anzahl bindender Untereinheiten und seine Toleranz gegenüber Substitution am Substrat liegen, wie bereits erwähnt, keine Studien vor. Die aktiven Zentren verschiedener Hydrolasen stellen allgemein unterschiedliche Anforderungen an die Länge der Sequenz unsubstituierter Bereiche, die zur Bindung des Substrats an die Untereinheiten des Enzyms und somit zur Ausbildung des katalytisch aktiven Enzym-Substrat-Komplexes notwendig ist (siehe Abb. 5-3, Kapitel 5.2). Die Wahrscheinlichkeit, höhere unsubstituierte Oligomere im Polymer vorzufinden, sinkt mit der absoluten Menge an c_0 . Bei 30 Mol-% Glucose (DP 1) liegt die zu erwartende Menge an unsubstituierter Isomaltotriose - statistische Verteilung vorausgesetzt - bereits nur noch bei 2,7 Mol-% für Isomaltotetraose sogar nur bei 0,8 Mol-% (Abb. 6-31).

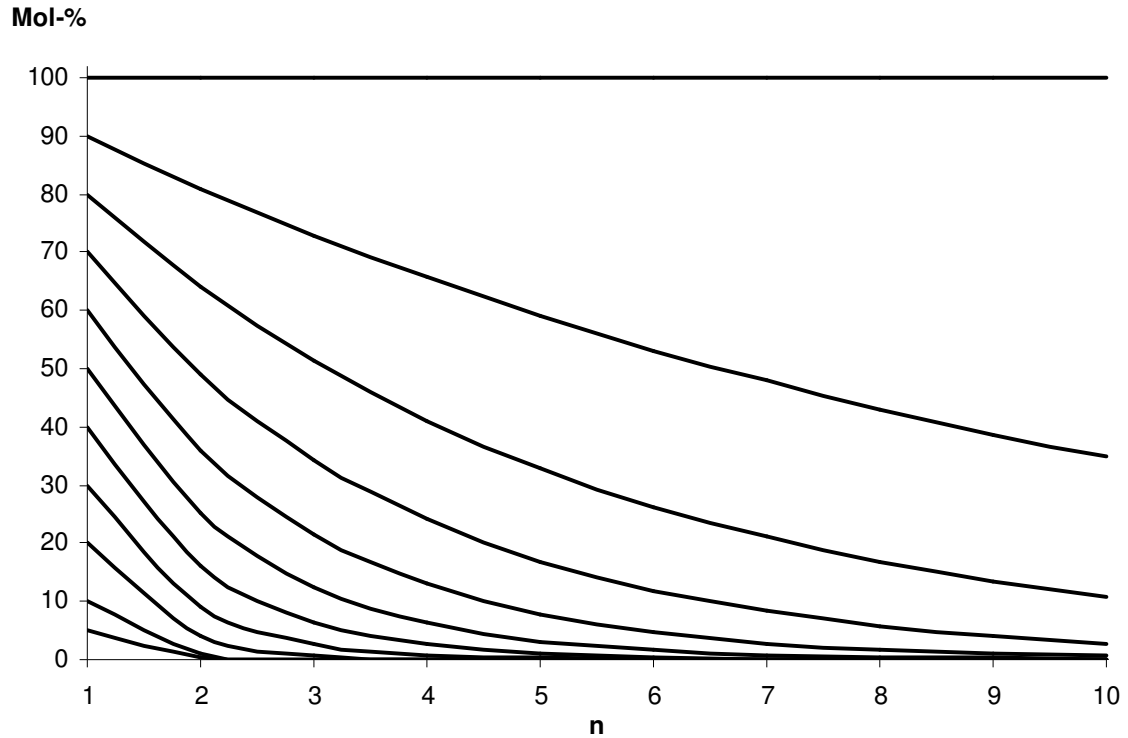


Abb. 6-31 Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Sequenzen unsubstituierter Glucosebausteine (n = Anzahl der Glucose je Sequenz) in Abhängigkeit vom molaren Anteil c_0 (unsubstituierte Glucose).

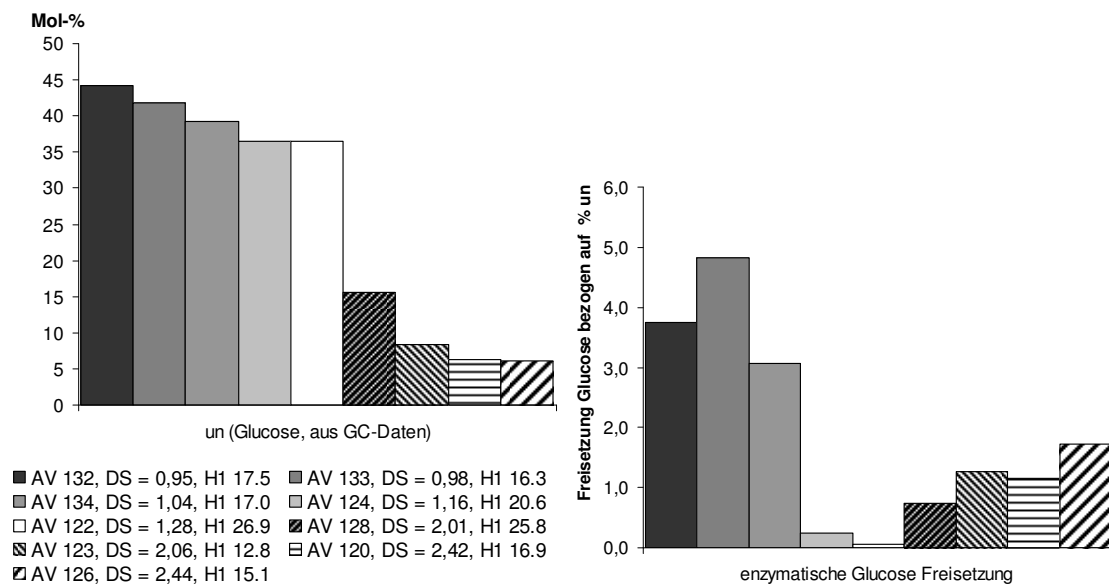


Abb. 6-32 Vergleich der in Allyldextranen enthaltenen Menge unsubstituierter Glucose (c_0 , Mol-% aus GC-Analytik, links) und Gegenüberstellung der hiervon enzymatisch freisetzbaren Glucose in % (rechts).

Vergleicht man die Glucosefreisetzung aus Allyldextranen derselben mittleren Ausgangsmolmasse und ähnlicher DS-Werte, können leichte Abweichungen resultierend aus unterschiedlichen Synthesebedingungen beobachtet werden.

Die Allyldextrane AV 122, 124 und 133 (M_w 500 kDa) haben ähnliche DS-Werte um $1,1 \pm \text{ca. } 0,15$. AV 122 und 124 wurden mit NaOH/ AlCl_3 synthetisiert, AV 133 dagegen mit Li-Dimsyl/ AlCl_3 . Die Heterogenität H_I (siehe 6.1.2.6) ist bei AV 133 mit 16,3 zwar unerwartet hoch für ein unter homogenen Bedingungen synthetisiertes Polysaccharidderivat, aber dennoch geringer als bei den NaOH-Proben (H_I AV 124 = 20,6, H_I AV 122 = 26,9). Die Glucose-Freisetzung bei AV 133 ist mit 4,8 % deutlich höher als bei den anderen beiden (0,24 bzw. 0,06 %, vgl. Abb. 6-32). Die höhere Heterogenität bei vergleichbarem DS sollte eigentlich mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für längere mittlere Blocklängen unsubstituierter Sequenzen einhergehen. Demzufolge müsste aus den heterogeneren NaOH-Proben anteilig mehr Glucose freigesetzt werden können. Dieses ist jedoch nicht der Fall. Diese Beobachtung spricht für die erwähnte Unzugänglichkeit des Dextrans durch eine periphere Abschirmung bei der Polyanionbildung und Substitution. Die höhere Heterogenität ist sehr wahrscheinlich ein Resultat der Deprotonierung der OH-Gruppen, welche einzig an der Kontaktfläche zwischen der Oberfläche der fein dispergierten festen NaOH und dem Polymer geschieht. In der Folge kann nur dort eine Substitutionsreaktion durch das Allylhalogenid stattfinden. Für diese Art der Synthese mit ungelöster, dispergierter Base ist eine höhere Heterogenität des erhaltenen Materials typisch (siehe auch 6.1.1).

Bei vergleichbarer Heterogenität ($H_I = 16,3$ bis 17,5) und DS-Werten um 1,0 zeigen die mit Li-Dimsyl/ AlCl_3 hergestellten Allyldextrane AV 132 (M_w 6 kDa), AV 134 (M_w 40 kDa) und AV 133 (M_w 500 kDa) auch eine vergleichbare Glucose-Freisetzung von $3,9 \pm 0,9$ %.

Der enzymatische Abbau der Allyldextrane mit Dextranase aus *Chaetomium erraticum* ist zusammenfassend wenig aussagekräftig, da die freisetzbare Glucosemenge in allen Fällen extrem niedrig ist. Für eine tiefergehende Interpretation ist eine Charakterisierung der Toleranz des aktiven Zentrums des abbauenden Enzyms erforderlich. Gegebenenfalls ist die Suche nach alternativen Dextranasen mit größerer Toleranz sowie mit verschiedener Selektivität anzustreben. Diese Erkenntnisse könnten neue Perspektiven in der Analytik

der Substituentenverteilung auf Polymerebene für Dextranderivate eröffnen. Auch kann die weitergehende instrumentelle Analytik der Oligomergemische (siehe Abschnitt 5.2) aus den Dextranabbauten neue Informationen über die Verteilung im Polymer liefern.

6.1.2.8 Oligomeranalytik nach Partialabbau

Der Vergleich der experimentell erhaltenen Daten mit dem statistischen Modell (6.1.2.6) sowie der enzymatische Abbau (6.1.2.7) hinterlassen offene Fragen. Daher ist es umso interessanter, die Substituentenverteilung entlang der Polymerkette (vgl. Abb. 5-2, Abschnitt 5.2) zu untersuchen.

ESI-MS-Messungen nach statistischem Partialabbau von Polysaccharidderivaten zu Oligomeren geben Aufschluss über die Verteilung der Substituenten innerhalb der Kette. Um quantifizierbare Messergebnisse zu erhalten, müssen die chemischen Unterschiede der verschieden hoch substituierten Oligosaccharide nivelliert werden (siehe auch Abschnitt 5.2). Die Bildung geladener Addukte – bei Kohlenhydraten meist $[M+Na]^+$ -Ionen – hängt in hohem Maße von der Komplexbildungsfähigkeit der Analyten ab. Bei Oligosacchariden erfolgt diese über die Sauerstoffatome und nimmt in der Regel durch eine Veretherung stark zu. Demzufolge werden niedrig substituierte Oligomere gegenüber hoch substituierten stark diskriminiert. Für Methylether wurde dieser Umstand durch Permethylierung mit deuteriertem Methyliodid, also einer Isotopenmarkierung bei chemischer Vereinheitlichung, erfolgreich gelöst^[197] (siehe auch Abschnitt 7.2). Daher wurden die Allyldextrane vor einem Partialabbau mit deuteriertem Propylbromid ($PrBr-d_7$) vollständig verethert. Hieraus ergibt sich ein Massenunterschied von 9, der durch Hydrierung der Allylreste auf 7 verringert werden kann (siehe Abb. 6-33). Gleichzeitig können so unterschiedliche Komplexbildungsverhalten aufgrund des ungesättigten Charakters ausgeschaltet werden. Eine Propylierung mit normalem Propylbromid lieferte eine Massendifferenz von nur 2 pro Substituent, welche aufgrund der bei der hohen C-Anzahl signifikanten Isotopenpeaks $M+1$ und $M+2$ weniger geeignet ist.

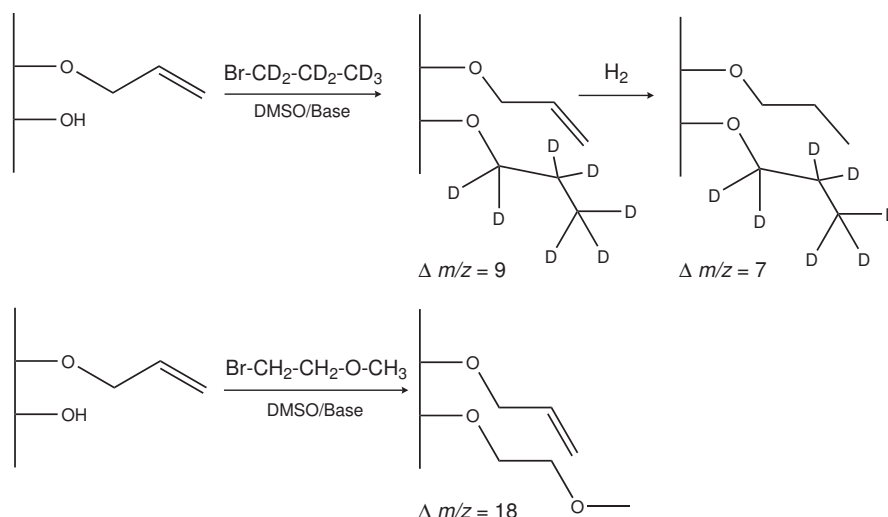


Abb. 6-33 Derivatisierungen zur Oligomeranalytik von Allyldextranen. Oben: Peralkylierung mit Brompropan- d_7 mit optionaler anschließender Hydrierung. Unten: Peralkylierung mit Methoxyethylbromid sowie die zu erwartenden Massendifferenzen zur Allyl-Substitution.

Der Abbaugrad der deuteropropylierten Allylpolysaccharide nach verschiedenen Methanolysezeiten (10 bis 40 min, 1,5 M methanolische HCl, 90 °C) wurde mittels ESI-MS kontrolliert. Es wird eine charakteristische Verteilung für die verschiedenen Isomere des jeweiligen Polymerisationsgrades (Degree of Polymerisation, DP) erhalten (vgl. Abb. 6-34 und Abb. 6-35).

Wie aus den dargestellten ESI-Massenspektren zu ersehen, konnten die erwarteten m/z -Signale und Massendifferenzen detektiert werden. Allerdings traten hierbei zwei Probleme auf: Zum einen ist das Allyldextran nicht vollständig deuteropropyliert worden, wie aus den rot markierten Signalen hervorgeht. Hierbei wurden von den zwei (Verzweigungen) bzw. drei Hydroxygruppen der Glucose (DP 1) nur eine ($m/z = 257, 266$) bzw. zwei ($m/z = 297, 306, 315$) substituiert, was zur Folge hat, dass eine quantitative Auswertung der Messungen nicht möglich war.

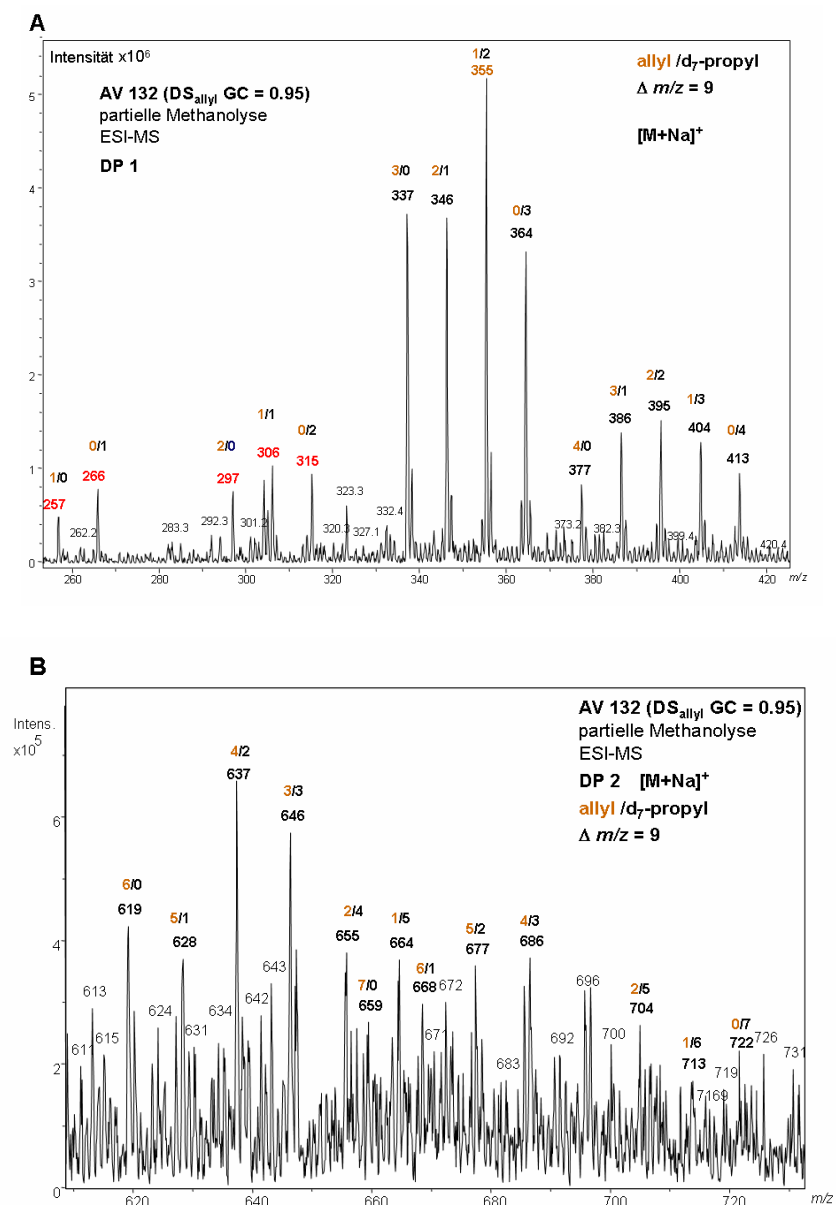


Abb. 6-34 ESI-MS A: DP 1, B: DP 2 Bereich von Allyldextran AV 132 (DS_{allyl} 0.95) nach Perdeutero-**propylierung** und partieller Methanolyse. rote Signale: nicht vollständig alkyliert oder Verzweigungsstücke. Zahlen bedeuten Anzahl Allylgruppen / Anzahl Deuteropropylgruppen ($\Delta m/z = 9$).

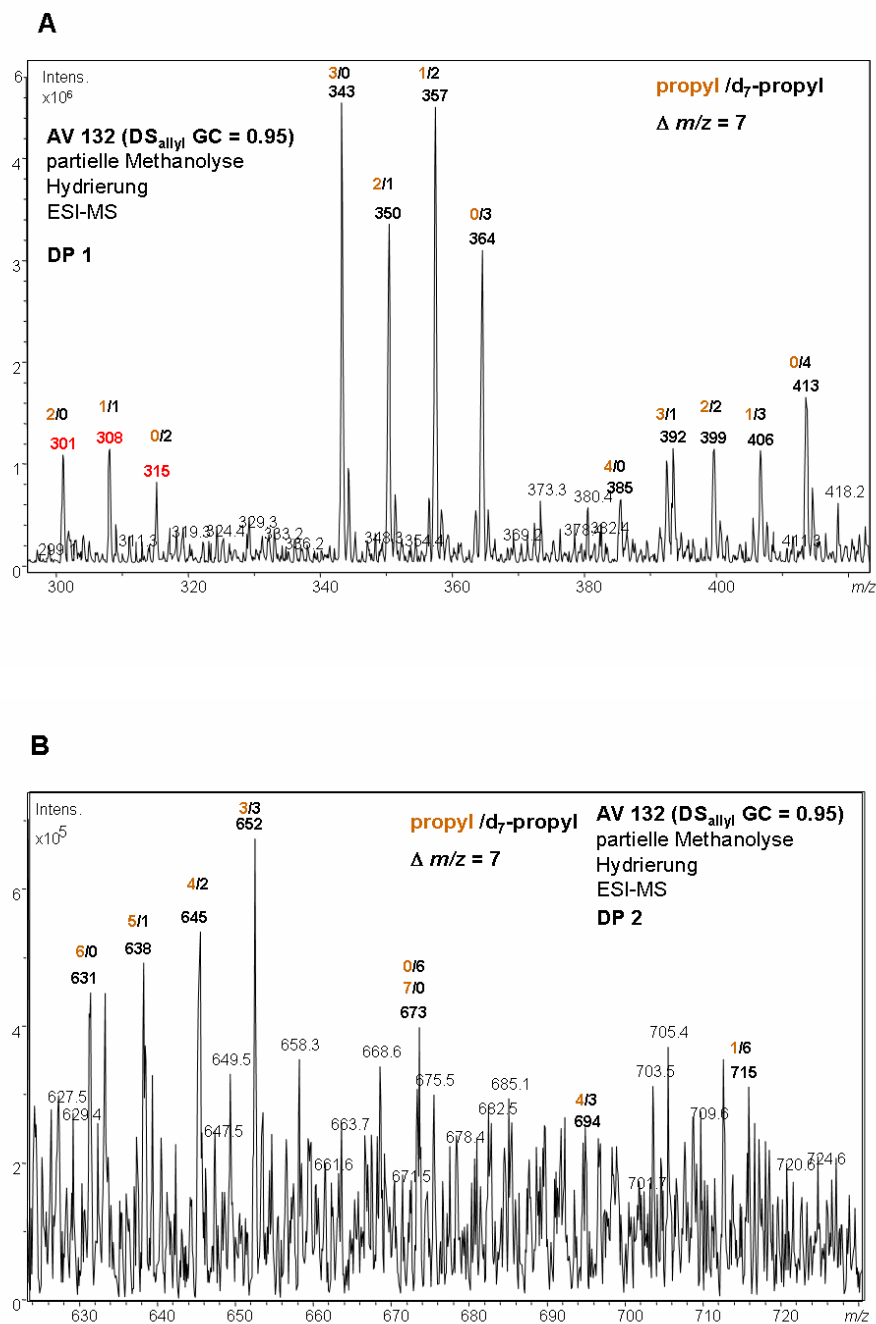


Abb. 6-35 ESI-MS **A: DP 1, B: DP 2** Bereich von Allyldextran **AV 132 (DS 0.95)** nach **Perdeuteropropylierung**, partieller Methanolyse und **Hydrierung**. Zahlen bedeuten Anzahl Propylgruppen/ Anzahl Deuteropropylgruppen ($\Delta m/z = 7$).

Zudem werden die Endgruppen, welche bei vollständiger Alkylierung vier Substituenten tragen, offensichtlich besser komplexiert (Verzweigungsgrad der Dextrane ca. 5 %) und erscheinen somit im Massenspektrum überrepräsentiert (vgl. Abb. 6-34, $m/z = 377-413$). Unteralkylierte terminale Glucosen sind massengleich den trisubstituierten AGUs und

somit als solche nicht unterscheidbar. Eine andere Erklärung dieses Effektes ist ein nicht statistisch, sondern selektiv verlaufender Partialabbau der glykosidischen Bindungen, so dass kein repräsentatives Bild erhalten wird. Ursache hierfür ist die im Vergleich zu α -(1 \rightarrow 6)-Bindungen leichtere Spaltung von α -(1 \rightarrow 3) glykosidischen Bindungen der Verzweigungsstellen^[8,227,228], was in der Folge zu einer schnelleren Freisetzung der terminalen Glucosen führt. So beträgt die Reaktionskonstante erster Ordnung für die Hydrolyse der α -(1 \rightarrow 6)-verknüpften Isomaltose bei 80 °C in 0,1 M HCl nur $0,40 \cdot 10^5 \text{ k/sec}$, während sie für die α -(1 \rightarrow 3) verknüpfte Nigerose bei $1,78 \cdot 10^5 \text{ k/sec}$ liegt und diese folglich 4,5 mal schneller gespalten wird^[228]. Dieser Erklärungsansatz konnte anhand der Studien an Methyl-dextranen später bestätigt werden (siehe Kapitel 7.2).

Das zweite Problem ist die unzureichende Intensität der m/z -Signale im Bereich DP 2 und höher. Die schneller gespaltenen Verzweigungen sind in der Regel nur 1-2 Glucosebausteine lang^[19], so dass die Mengen an DP 1 und 2 auch nach kurzen Abbauzeiten bereits signifikant sind. Zum anderen werden höhere Oligomere (> DP 2) in der Regel im ESI-MS mit geringerer Intensität angezeigt. Hier könnte möglicherweise eine Variation der Messbedingungen Abhilfe schaffen. Bei einer Hydrolyse traten, wie für (1 \rightarrow 6)-Glucane erwartet, Nebenprodukte durch Anhydrozuckerbildung ($-\Delta m/z$ 18) aus OH-Gruppen (Verzweigungsstücke nach Spaltung) und wahrscheinlich auch intramolekulare Additionsreaktionen von 2-Allyl (vgl. Abb. 6-5) auf. Letztere sind im Massenspektrum aufgrund der Massengleichheit jedoch nicht identifizierbar. Die partielle Methanolyse ist daher der Hydrolyse als Abbauart vorzuziehen.

Bei einer ersten Abschätzung des Allyl-DS aus den erhaltenen ESI-Massenspektren nach Perdeuteropropylierung des Allyldextrans, erhält man Werte, die ohne Hydrierung mit 1,5 (DP 1)/ 1,7 (DP 2) und terminal 2,0 (DP 1)/ 2,0 (DP 2) bzw. mit Hydrierung 1,6 (DP 1)/ 1,6 (DP 2) und terminal 1,6 (DP 1)/1,8 (DP 2) deutlich über dem mittels GC analysierten Substitutionsgrad von 0,95 liegen. Die Hydrierung der Allylether hatte dabei nur wenig Einfluss auf die Komplexierungseigenschaften der Oligomere. Der Deuteropropylsubstituent kompensiert somit die Diskriminierung niedrig substituierter Oligosaccharide noch nicht hinreichend. Daher wurde alternativ Methoxyethylbromid (BME) zur Peralkylierung eingesetzt (siehe Abb. 6-33). Dessen Ether-Sauerstoff sollte die Natriumkomplexierung begünstigen, wie es aus der Analytik von Hydroxyalkylcellulosen

bekannt ist^[208,209]. Ein Methoxyalkylsubstituent sollte also die Diskriminierung infolge freier OH-Gruppen besonders gut kompensieren können.

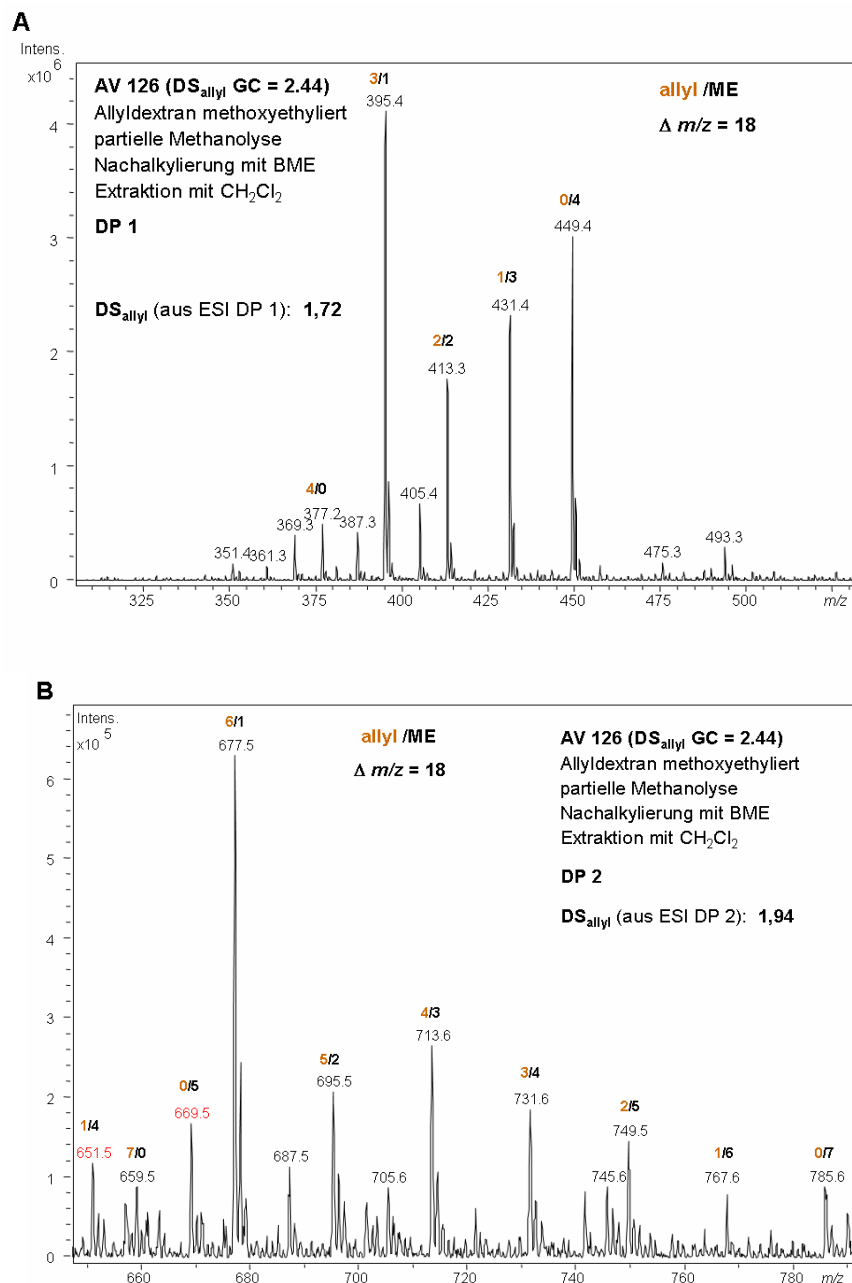


Abb. 6-36 ESI-MS **A: DP 1, B: DP 2** Bereich von Allyldextran **AV 126 (DS 2.44)** nach Alkylierung mit Methoxyethylbromid (BME), partieller Methanolyse, Nachalkylierung mit BME und Extraktion mit CH₂Cl₂ Zahlen bedeuten Anzahl Allylgruppen/Anzahl ME-Gruppen ($\Delta m/z = 18$).

Die Allyldextrane AV 126 (DS_{allyl} 2,44) und AV 140 (DS_{allyl} = 0,09) wurden mit BME alkyliert. Auch hier erfolgte die Umsetzung der OH-Gruppen trotz umfangreicher Variation der Reaktionsbedingungen nicht vollständig. Zur Abschätzung, ob sich

Methoxyethyl grundsätzlich eignet, wurden die Derivate dennoch durch Methanolyse abgebaut und mittels ESI-MS untersucht (siehe Abb. 6-36 und Abb. 6-37). Bei Allyldextran AV 140, welches einen sehr geringen Allyl-DS aufweist, konnten nur die Muster unterschiedlicher Alkylierungsgrade mit Methoxyethyl detektiert werden; Allylsubstitution wurde im ESI-MS nicht beobachtet. AV 126 wurde nach partieller Methanolyse erneut einer Alkylierung mit BME unterzogen. Somit kumulieren die Signale im m/z -Bereich der vierfach (DP 1) bzw. siebenfach (DP 2) alkylierten Methylglykoside.

Das ESI-Massenspektrum (Abb. 6-36) zeigt alle denkbaren Kombinationen aus Allyl- und ME-Ethern. Kalkuliert man aus den erhaltenen Intensitäten den Allyl-DS, so erhält man Werte von 1,72 (DP 1) bzw. 1,94 (DP 2), was in diesem Fall deutlich unter dem mittels GC bestimmten Wert (2,44) liegt. Die Diskriminierung niedrig substituierter Oligomere wird durch ME folglich überkompensiert, so dass auch auf diese Weise die quantitative Oligomeranalytik der Allyldextrane noch nicht möglich ist. Sofern eine Peralkylierung erreicht werden kann, erscheint die Derivatisierung mittels BME dennoch als die aussichtsreichere Methode zur chemischen Vereinheitlichung, um die ESI-Oligomeranalytik der Allyldextrane voranzutreiben.

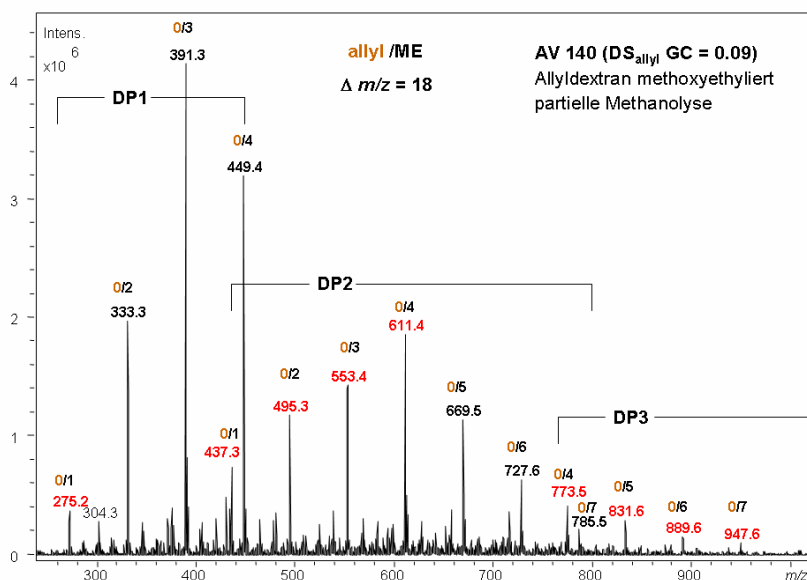


Abb. 6-37 ESI-MS DP 1-3 Bereich von Allyldextran AV 140 (DS 0.09) nach Alkylierung mit Methoxyethylbromid (BME) und partieller Methanolyse, rot: unteralkyliert, schwarz: peralkyliert oder Verzweigungsstücke. Zahlen bedeuten Anzahl Allylgruppen/ Anzahl ME-Gruppen ($\Delta m/z = 18$).

Die Schwierigkeit der ungleichen Hydrolysestabilitäten von α -(1 \rightarrow 6)- und α -(1 \rightarrow 3)-Bindungen des Dextrans bleibt jedoch auch bei den methoxyethylierten Allyldextranen bestehen. Um diesen Effekt besser zu erfassen, wurde im Folgenden eine umfangreiche Oligomeranalytik mit perdeuteromethylierten Methyl-dextranen durchgeführt (siehe Kapitel 7.2).

Eine Alternative der Oligomeranalytik könnte darin bestehen, die Ionisierung für die Massenspektrometrie zu variieren. In Kooperation mit dem Royal Institut of Technology in Stockholm wurden zahlreiche **MALDI-MS**-Messungen der abgebauten Allyl-deuteropropyl-Dextrane mit verschiedenen polaren Matrices durchgeführt. Diese Ionisierung ist für höhermolekulare Substanzen wie Oligomere prinzipiell die Methode der Wahl, jedoch konnten hier bislang keine interpretierbaren Massenspektren erhalten werden. Auch der Zusatz von Silber, welches mit den Doppelbindungen komplexieren kann, führte bislang nicht zu den erhofften Ergebnissen. Hier bedarf es weiterer Optimierung der Messbedingungen.

Auch mittels **HPLC-ELSD** (Evaporative Light Scattering Detector) kann die Analytik von Oligosaccharidgemischen erfolgen^[229]. In der vorliegenden Arbeit wurden die deuteropropylierten bzw. methoxyethylierten Allyldextrane AV 130, 132, 126 und 140 nach partieller Methanolyse mittels HPLC (Hexan, Aceton, 1:1, isokratisch) an einer Normalphase (Kieselgel) getrennt. Als Standards wurden die Methylglykoside von Isomaltose (α/β) und Glucose (α) jeweils mit Allylchlorid, BME oder Brompropan-*d*₇ alkyliert und die Retentionszeiten verglichen. Interessanterweise zeigten sämtliche Allylderivate (Isomaltose, Glucose, hochsubstituierte Allyldextrane) im ELSD ein extrem schwaches *S/N*-Verhältnis, so dass eine Auswertung der Chromatogramme nicht möglich war. Dieser Effekt ist bislang nicht zu erklären. Lediglich das sehr niedrig substituierte und partiell methoxyethylierte Allyldextran AV 140 zeigte im ELSD Signale, welche dem Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methoxyethyl- α/β -glcp (*R*_t: β 8,5 min, α : 9,0 min) sowie Methyl-2,3,4,2',3',4',6'-hepta-*O*-methoxyethyl- α/β -isomaltosid zuzuordnen sind (siehe Abb. 6-38). Unvollständig substituierte und daher polarere Isomere eluieren erst sehr viel später von der Normalphase, weshalb hier nur die peralkylierten Oligomere erfasst wurden. Nach 15 min Abbauphase wurden bei AV 140 Signale von DP 1 und 2, jedoch keine höheren Oligomere detektiert. Dieses deutet erneut auf die schnellere Spaltung der kurzen

Verzweigungen des Dextrans hin. Nach 30 min Methanolyse werden schließlich nur noch DP 1 und sehr wenig DP 2 detektiert.

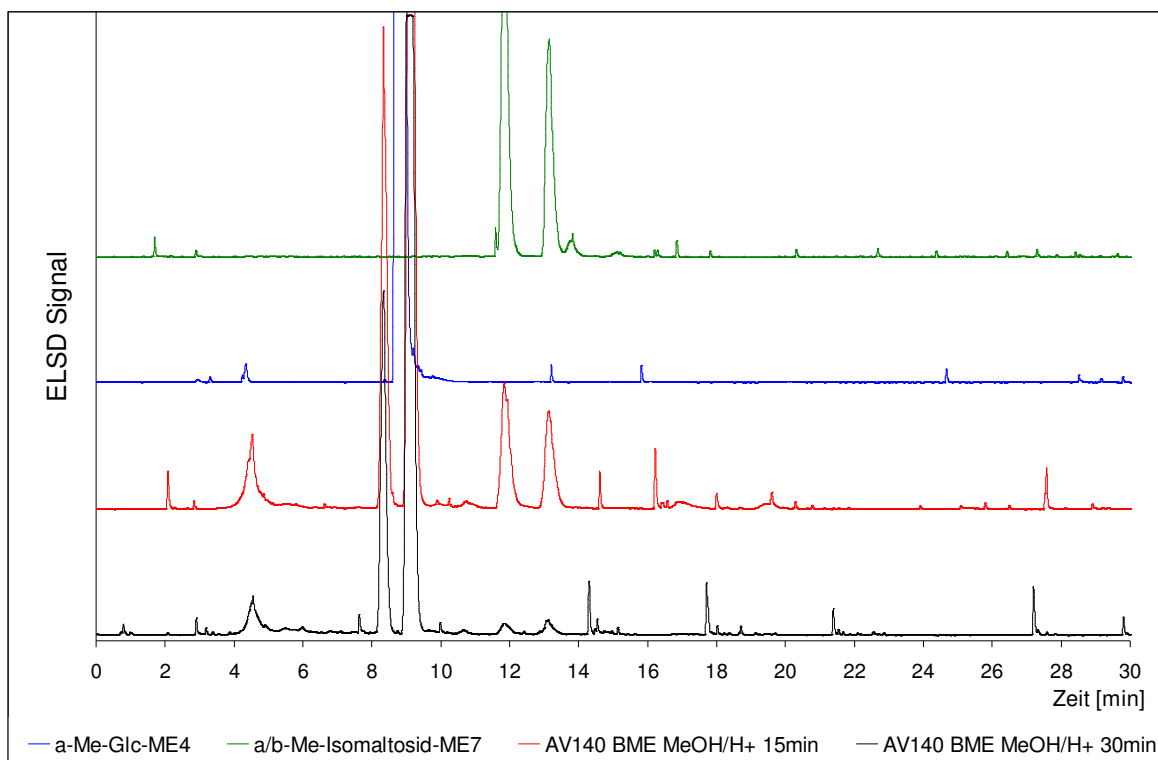


Abb. 6-38 HPLC-ELSD Chromatogramm von Allyldextran AV 140 ($DS_{\text{allyl}} = 0,09$) alkyliert mit BME, Methanolyse 15 min (rot) und 30 min (schwarz). Als Vergleich die Chromatogramme von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methoxyethyl- α -D-glucopyranosid (blau) und Methyl-2,3,4,2',3',4',6'-hepta-*O*-methoxyethyl- α/β -D-isomaltosid (grün). Säule: Normalphase (Kieselgel), Fließmittel: Aceton/Hexan (1/1).

6.2 Vergleich von Allyldextran mit Allylstärke und Allylamylose

Die Allylierung alternativer Polysaccharide sollte Besonderheiten des Dextrans bzw. der Allylierungsreaktion an sich aufzudecken. Daher wurden Kartoffelstärke und Amylose im Vergleich zu Dextran umgesetzt. Diese vorwiegend $\alpha(1\rightarrow4)$ verknüpften (Amylose) und zusätzlich zu etwa 5 % $\alpha(1\rightarrow6)$ verzweigten (Amylopektin, Stärke) Glucane (siehe Abschnitt 1.1) haben von Dextran abweichende physikalische Eigenschaften, wie z. B. hinsichtlich Löslichkeit und Überstrukturbildung (z.B. helicale Struktur der Amylose).

Dextran (M_w 500 kDa) und Amylose (*Sigma type III from potato*) lösen sich bei der Synthese in DMSO mit klarer Lösung. Stärke (*native potato starch, Lyckeby*) quillt sehr stark und es verbleibt eine trübe viskose Lösung. Erst bei Zugabe des Allylbromids bricht

das Gel auf und wird flüssig. In einem parallel geführten Versuchsansatz wurden Dextran (M_w 500 kDa), Amylose und Stärke mit je 6,0 Äquivalenten pro OH Natriumhydroxid und Allylbromid für drei Tage bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Nach Dialyse (MWCO 3,5 kDa) und Gefriertrocknung wurden die Produkte gaschromatographisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 6-5 gegenübergestellt.

Tab. 6-5 Allyl-Monomermuster von parallel synthetisierten Allyldextran, Allylamylose und Allylstärke.

Allyl- muster	AV 88 D Dextran [Mol-%]	AV 88 A Amylose [Mol-%]	AV 88 S Stärke [Mol-%]
2,3,4,6	3,58	1,58	1,38
2,3,6		67,90	47,61
2,3,4	50,91		
2,6		7,59	17,81
3,6		3,99	3,74
2,3	5,67	9,69	8,78
2,4	8,24		
3,4	5,55		
6		3,80	5,39
2	13,27	1,95	5,84
3	1,47	1,33	1,26
4	5,23		
un	6,08	2,18	8,19
c_o	6,08	2,18	8,19
c_1	19,97	7,08	12,49
c_2	19,46	21,26	30,33
c_3	50,91	67,90	47,61
c_4	3,58	1,58	1,38
x_2	0,82	0,89	0,81
x_3	0,67	0,84	0,63
x_4	0,74	0,02	0,01
x_6	0,04	0,85	0,76
DS	2,26	2,60	2,21

Der erhaltene Substitutionsgrad liegt bei Dextran und Stärke mit 2,26 bzw. 2,21 in einem vergleichbaren Bereich, wohingegen Amylose mit 2,60 einen deutlich höheren DS-Wert aufweist. Die höhere Effizienz der Alkylierung von Amylose im Vergleich mit Dextran wurde auch bei anderen parallel geführten Alkylierungen (Pentinylierung, Hexinylierung)

beobachtet. Dieses ist vermutlich auf die höhere Reaktivität der primären 6-OH Gruppe im Vergleich zur sekundären 4-OH-Gruppe zurückzuführen. Methylierungen von Pullulan, welches aus α -(1 \rightarrow 6) verknüpften Maltotrioseeinheiten besteht und somit ein Verhältnis von 6-OH zu 4-OH von 2 : 1 aufweist (vgl. Kapitel 1.1), zeigten eine durchschnittliche Substitution von 20 % in Position 6 und nur 8 % in Position 4 (6-OH/4-OH = 2,5 : 1), was die höhere Reaktivität der 6-OH Gruppe belegt. Während beim Allyldextran die Regioselektivität in bekannter Weise $2 > 4 > 3$ beträgt, nimmt der Grad der Substitution bei Allylamylose und Allylstärke in der Reihenfolge $2 \geq 6 > 3$ ab. Terminale 2,3,4,6-substituierte Glucosen werden in allen drei Ansätzen beobachtet, wobei der relative Anteil im Dextran mit 3,58 Mol-% mehr als doppelt so hoch ist wie bei den Stärke- und Amyloserivaten. Dieses Ergebnis steht mit dem höheren Verzweigungsgrad des Dextrans (ca. 9 %) in Einklang. In allen Derivaten überwiegt der trisubstituierte Anteil c_3 , was bei dem großen Überschuss an NaOH und AlBr pro OH nicht überrascht.

Addiert man 2,3,4,6-tetra-*O*-allyl zu den jeweiligen trisubstituierten Monomeren (2,3,4 bzw. 2,3,6) und vergleicht die experimentellen Daten mit den nach dem unter 6.1.2.6 genannten statistischen Modell, zeigen sich die folgenden Trends (Abb. 6-39 bis Abb. 6-41).

Das Allyldextran AV 88D weist wie gehabt die positive Abweichung von c_0 und c_3 zu Lasten des c_2 -Anteils auf. Die monosubstituierten AGUs sind bei diesem Dextran im Vergleich zum statistischen Modell nicht erniedrigt. Die durchschnittliche Abweichung, ausgedrückt als Heterogenität H_I , beträgt 22. Ein ähnliches Bild findet man auch bei Allylstärke. Diese zeigt ebenfalls die für die meisten Allyldextrane typische positive Abweichung von c_0 und c_3 zu Lasten des c_1 und c_2 Anteils. Ihr H_I Wert beträgt 15, was noch immer von einer starken Abweichung zeugt. Bei Allylamylose zeigt sich ein durchweg anderes Bild. Hier ist die Abweichung vom Modell geringer und lediglich bei der disubstituierten Fraktion c_2 signifikant erniedrigt. Dieses resultiert in einer durchschnittlichen Abweichung H_I von 9, was jedoch für ein Allylpolysaccharid mit einem DS von 2,60 dennoch ein hoher Wert ist, da hier wegen der Substitution der meisten OH-Gruppen kaum noch Heterogenität möglich ist.

Zur groben Abschätzung und Vergleich von Heterogenitäten bei verschiedenen DS-Werten, wurde empirisch ein Wert H_I' gefunden, welcher das Verhältnis von H_I zur

Quadratwurzel aus DS bzw. bei $DS > 1,5$ zur Quadratwurzel aus $(3-DS)$ angibt. Angewandt auf die Allylpolysaccharide ergeben sich hiermit H_1' -Werte von 26 bei Allyldextran, Allylstärke 17 und Allylamylose 14 und somit in dieser Reihenfolge abnehmende Heterogenitäten.

Als Erklärung für diese Effekte kommen mehrere Ursachen in Frage. Zum einen unterscheiden sich die eingesetzten Polysaccharide in ihrer Löslichkeit in DMSO. Die gut lösliche Amylose ist homogen in der Lösung verteilt und so jede AGU in gleicher Weise für die Adsorption an der festen NaOH zugänglich. Diese gleiche Zugänglichkeit wird nach derzeitigem Erkenntnisstand bei Dextran angezweifelt. Hier liegen möglicherweise schwer bis nicht zugängliche Domänen vor. Die Stärke war offensichtlich nicht gut in DMSO gelöst worden, worauf die milchige Erscheinung der Lösung und die Gelierung hinweisen. Diese Bereiche guter und weniger guter Zugänglichkeit könnten in Folge zu einer ungleichmäßigen Substitution geführt haben.

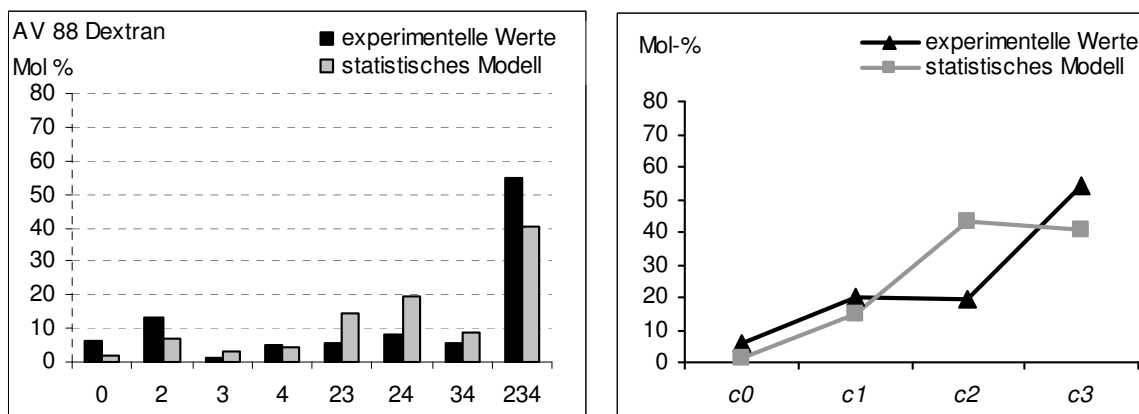


Abb. 6-39 AV 88 **Allyldextran**, M_w 500 kDa, 6 Äq./OH NaOH, AlIBr, DS 2.26, $H_1 = 22.0$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituerter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

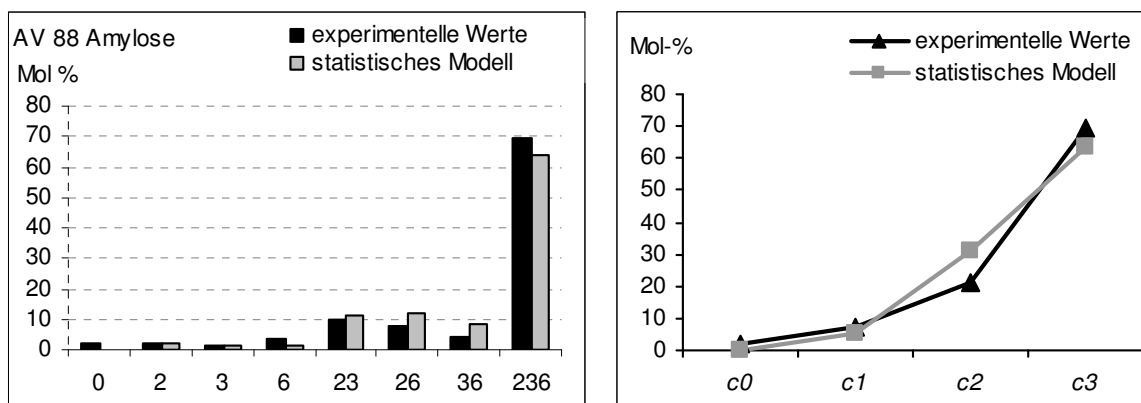


Abb. 6-40 AV 88 **Allylamylose**, M_w 960 kDa, 6 Äq./OH NaOH, AllBr, DS 2.60, $H_1 = 9.0$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituerter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

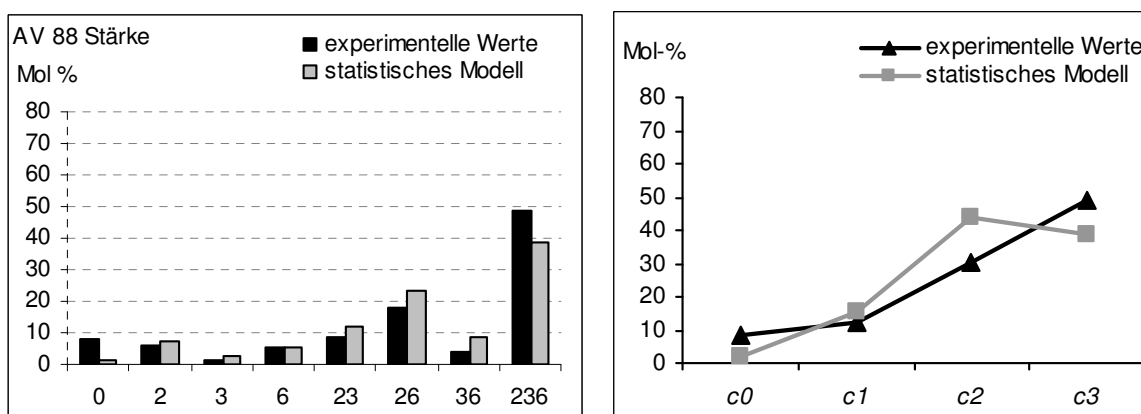


Abb. 6-41 AV 88 **Allylstärke**, $M_w > 6000$ kDa, 6 Äq./OH NaOH, AllBr, DS 2.21, $H_1 = 14.7$. Vergleich der relativen molaren Zusammensetzung unterschiedlich substituerter Glucosen mit einem statistischen Modell. Links: Allylmonomermuster, rechts: un-, mono-, di-, tri-allylsubstituierte Glucose.

Eine weitere Erklärung sind die unterschiedlichen Verzweigungs- und Polymerisationsgrade (DP) der Polyglucane. Das eingesetzte Dextran verfügt über ca. 9 % Verzweigungen in O-3 und einen DP von ca. 3000 (M_w 500 kDa). Die eingesetzte Amylose besitzt einen DP von 5900 (M_w 960 kDa) und die Kartoffelstärke einen DP > 6000 ($M_w > 1000$ kDa). Von der verwendeten Stärke und Amylose liegen keine konkreten Verzweigungsdaten vor. Jedoch beträgt der durchschnittliche Verzweigungsgrad von Amylose 0,3-0,5 %^[230] und von Amylopektin ca. 5 %^[231], wonach die Kartoffelstärke (ca. 75 % Amylopektin^[120]) in etwa eine Verzweigung von 3-4 % aufweisen sollte. Die DS-Werte der beiden stärker verzweigten Polyglucane Dextran und Stärke lagen mit 2,26 bzw. 2,21 im gleichen Bereich, wohingegen bei der wenig verzweigten Amylose mit 2,60

unter identischen Bedingungen ein deutlich höherer Substitutionsgrad erzielt wurde. Die minimale Verzweigung der Amylose sorgt möglicherweise für eine homogenere Zugänglichkeit des Moleküls, wodurch für Allylamylose ein dem statistischen Modell angenähertes Substitutionsmuster erhalten wird.

Um den Einfluss der Polyglucanstrukturen weiter zu erforschen, sollten zukünftig weitere parallel geführte Allylierungen mit Dextran, Amylose und Stärke mit Li-Dimsyl als Base durchgeführt werden. Auf diese Weise wird die Adsorption an NaOH als Einflussfaktor ausgeschlossen, wodurch die Ergebnisse besser reproduzierbar und die Daten des Polysaccharidvergleichs belastbarer werden sollten.

6.3 Studien zur Vernetzung von Allylethern

Wie in den Kapiteln 3.2.2 und 6.1.2.5.5 bereits erläutert wurde, zeigen Allylderivate häufig eine unzureichende Stabilität und sind in der Folge wenig löslich in organischen Lösungsmitteln. Hierdurch sind Charakterisierung und weitere Funktionalisierungen erschwert. Um die Stabilität von Allylethern anhand einer einfachen Modellschubstanz studieren zu können, wurde Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-allyl- α -D-glucopyranosid (**17**) synthetisiert. Dieses Monosaccharid wurde in Dichlormethan gelöst (ca. 100 mg/mL) und verschiedenen Bedingungen ausgesetzt:

- UV-Bestrahlung (366 nm, 3,5 mW/cm², 1 cm Abstand), 60-90 min
- Erhitzen auf 60 °C, 15 h bei Tageslicht
- Einleitung von Luft, 3.5 h, bei Tageslicht
- Zusatz des Radikalstarters AIBN (1 Mol-% bezogen auf **17**)
- Hydrochinonzusatz (ca. 1 mg/mg **17**)

sowie verschiedene Kombinationen hieraus. Die Lösungen wurden anschließend visuell und mittels Elektrospray-Massenspektrometrie untersucht. Eine intermolekulare Vernetzung sollte in einer Erhöhung der Viskosität sowie dem Auftreten von Oligomeren im MS resultieren.

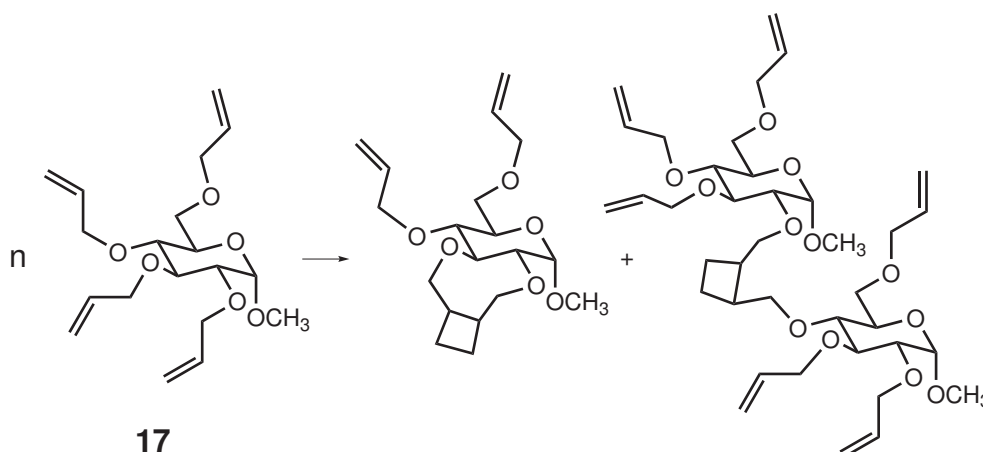


Abb. 6-42 Potentielle intra- und intermolekulare Vernetzungsmöglichkeiten von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-allyl- α -D-glucopyranosid (**17**).

Es war unter keiner der genannten Bedingungen und Kombinationen der Behandlungen eine Erhöhung der Viskosität erkennbar. Auch die Massenspektren zeigten lediglich das intensive Signal von **17** ($[M+Na]^+$ $m/z = 377$), welches die für Allylether typische Abspaltung von Propen (-42) zeigt. Lediglich in Spuren wurden Signale eines Dimers ($[M+Na]^+$ $m/z = 731$) detektiert. Eine intermolekulare Reaktion der Methylglucoside konnte nicht forciert werden. Möglicherweise war die Konzentration von **17** in der Lösung noch zu gering oder bereits zu hoch: intramolekulare Reaktionen der einzelnen Allylgruppen miteinander würden mittels ESI-MS nicht erkannt.

Nach Beendigung der Studie wurden die Lösungen von **17** zur Trockene eingengt und bei Raumtemperatur gelagert. Hierbei wurden nach einigen Wochen harte, klare und glasartige Filme an der Gefäßwand erhalten. Offenbar hatten die Moleküle in der Festphase miteinander reagiert. Aufgrund der absoluten Unlösbarkeit und extremer Härte der Filme konnten diese leider nicht weiter analysiert werden. Hier könnten weitere Versuchsreihen zur Reaktion in der Festphase Hinweise über eine erfolgte Polymerisation und die Möglichkeiten deren Vermeidung geben.

6.4 Pentenyldextrane

Die Verlängerung des ungesättigten Ethers von C_3 (allyl) auf C_5 (pentenyl) sollte auch die Eigenschaften der erhaltenen Alkenyldextrane beeinflussen. Diese Pentenylether sollten beweglicher und flexibler sein und so möglicherweise in einer nachfolgenden Funktionalisierung der Doppelbindungen besser zugänglich und die Reaktivität der Doppelbindung noch besser entkoppelt vom Einfluss des Dextranrückgrats sein.

Die Synthese der Pentenyldextrane erfolgte analog der Allyldextrane in DMSO mit den verschiedenen Basen NaOH und Li-Dimsyl. Als Alkylierungsreagenz diente 5-Brom-1-penten. Nach mehreren Tagen Rühren bei Raumtemperatur wurden die Produkte dialysiert und gefriergetrocknet. Man erhielt in der Regel gelbe bis hellbraune feinkörnige Feststoffe, die sich im Gegensatz zu den Allyldextranen in den meisten Fällen zufriedenstellend in DMSO lösten.

6.4.1 Strukturelle Charakterisierung von Pentenyldextranen

Die Analytik der Pentenyldextrane erfolgte mittels ATR-IR-Spektroskopie, Elementaranalyse, NMR-Spektroskopie und nach Depolymerisation und Derivatisierung mittels Gaschromatographie.

6.4.1.1 ATR-IR-Spektroskopie

Die ATR-IR-Spektren der Allyl- und Pentenyldextrane ähneln sich aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft sehr stark. Einen Vergleich der ATR-IR-Spektren von Allyl- und Pentenyldextranen (M_w 500 kDa) ist in Abb. 6-43 gezeigt.

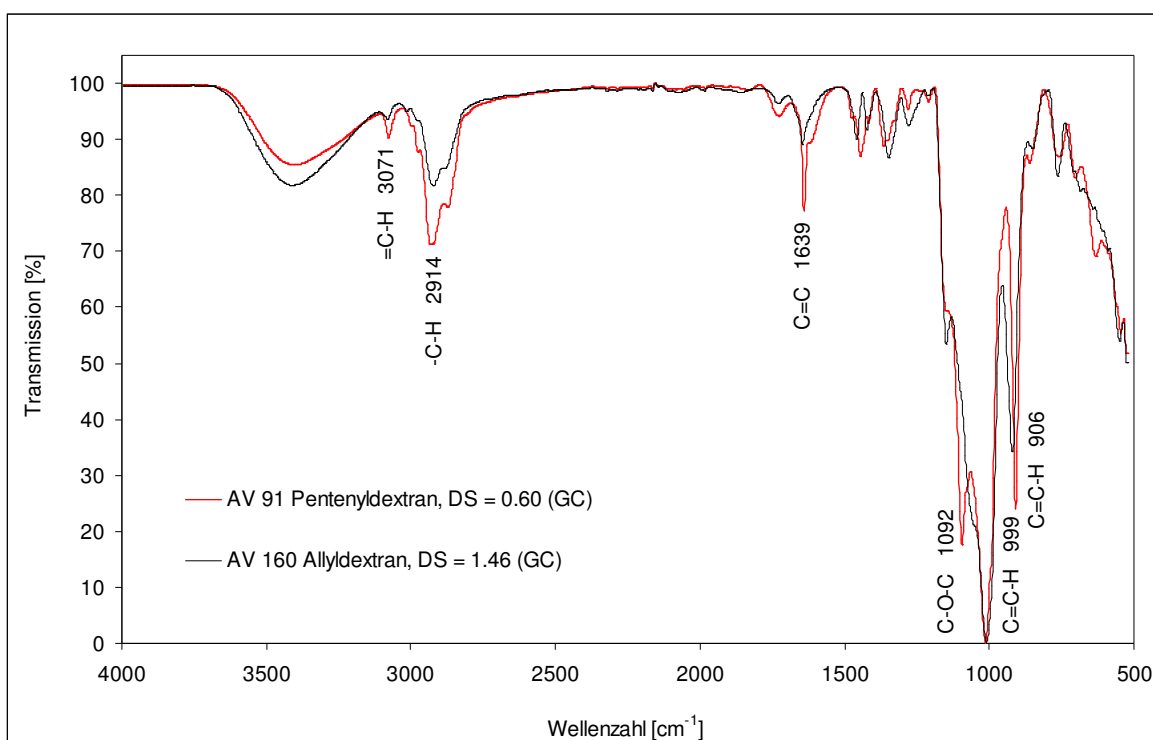


Abb. 6-43 Vergleich der ATR-IR-Spektren von Pentenyl- und Allyldextran.

Beide Dextrane ($DS_{\text{pentenyl}} = 0.60$, $DS_{\text{allyl}} = 1.46$) zeigen verbliebene OH-Streck-Schwingungen bei $3200\text{--}3570\text{ cm}^{-1}$ der unsubstituierten Hydroxygruppen, wobei deren Intensitäten abweichend von der GC-Analytik für $DS_{\text{pentenyl}} > DS_{\text{allyl}}$ spricht. Die C=C-Valenzschwingung der Allyl- bzw. Pentenylgruppen liegen bei 1640 cm^{-1} , wobei diese ebenso wie die =C-H-Valenzschwingung bei 3075 cm^{-1} bei Pentenyldextran erneut ausgeprägter erscheint. Beide Derivate zeigen die C=C-H-Deformationsschwingungen bei 999 und 906 cm^{-1} sowie die C-O-C-Deformationsschwingung der Ether bei 1092 cm^{-1} .

6.4.1.2 Elementaranalyse

Das theoretische C/H-Verhältnis bewegt sich bei Pentenyldextranen zwischen 7,15 ($DS = 0$) und 7,36 ($DS = 3$). Bei allen synthetisierten Pentenylderivaten war dieser Wert stets $< 7,0$ und damit zu niedrig ($DS < 0$). Auch hier scheinen Verunreinigungen, vermutlich hervorgerufen durch das Alkylierungsreagenz 5-Brom-1-penten, im Produkt vorzuliegen. Daher kann der Pentenyl-DS ebenso wie auch der Allyl-DS nicht durch EA berechnet werden.

6.4.1.3 NMR-Spektroskopie

Die Pentenyldextrane waren zufriedenstellend in DMSO löslich. Daher konnten hiervon ^1H -NMR-Spektren in $\text{DMSO-}d_6$ aufgenommen werden. Abb. 6-44 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von Pentenyldextran AV 90, $DS = 0,67$. Die erhaltenen Resonanzen der Protonen sind aufgrund des polymeren Charakters und der hohen Viskosität der Polymerlösung sehr breit. Daher sind einzelne Signale nicht aufgelöst. Das Proton am sp^2 -hybridisierten C-Atom der =CH-Gruppe ($4'$) erscheint bei 5,6 ppm. Die Methylenprotonen des Pentenylsubstituenten zeigen Resonanz bei 2,1 ppm ($3'_{a/b}$) und 1,59 ppm ($2'_{a/b}$). Die an den Glucose-Sauerstoff gebundene CH_2 -Gruppe ($1'_{a/b}$) erscheint zusammen mit den Zuckerprotonen H-2, 3, 4, 5, 6a, 6b von 2,9-4,1 ppm. Das H-1 Signal sowie die endständigen Protonen der Pentenyl-Doppelbindung ($5'_{a/b}$) liegen übereinander in einem Multiplett bei 4,8 ppm. Somit liegen keine Signale der AGU vor, die nicht durch Substituentensignale überlagert werden. Eine Abschätzung des Pentenyl-DS anhand der Verhältnisse der Protonensignale H-4' zu H-1 kann sehr grob nach folgender Gleichung erfolgen:

Normierung des Signals H-4' auf 1,00:

$$DS = \frac{\int H\ 4'}{[\int (H\ 5'_{a,b} + H\ 1) - 2]} \quad (16)$$

Nach dieser Abschätzung ergibt sich für AV 90 ein DS_{pentenyl} von 1,14 (GC: 0,67) und für AV 91 ein DS_{pentenyl} von 0,94 (GC: 0,60) und damit etwas höhere Werte als durch Gaschromatographie bestimmt.

Zur genaueren Analytik und Bestimmung des Monomermusters der Pentenyldextrane wurde auch bei diesen Derivaten die deutlich zeitaufwändigere Gaschromatographie genutzt, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

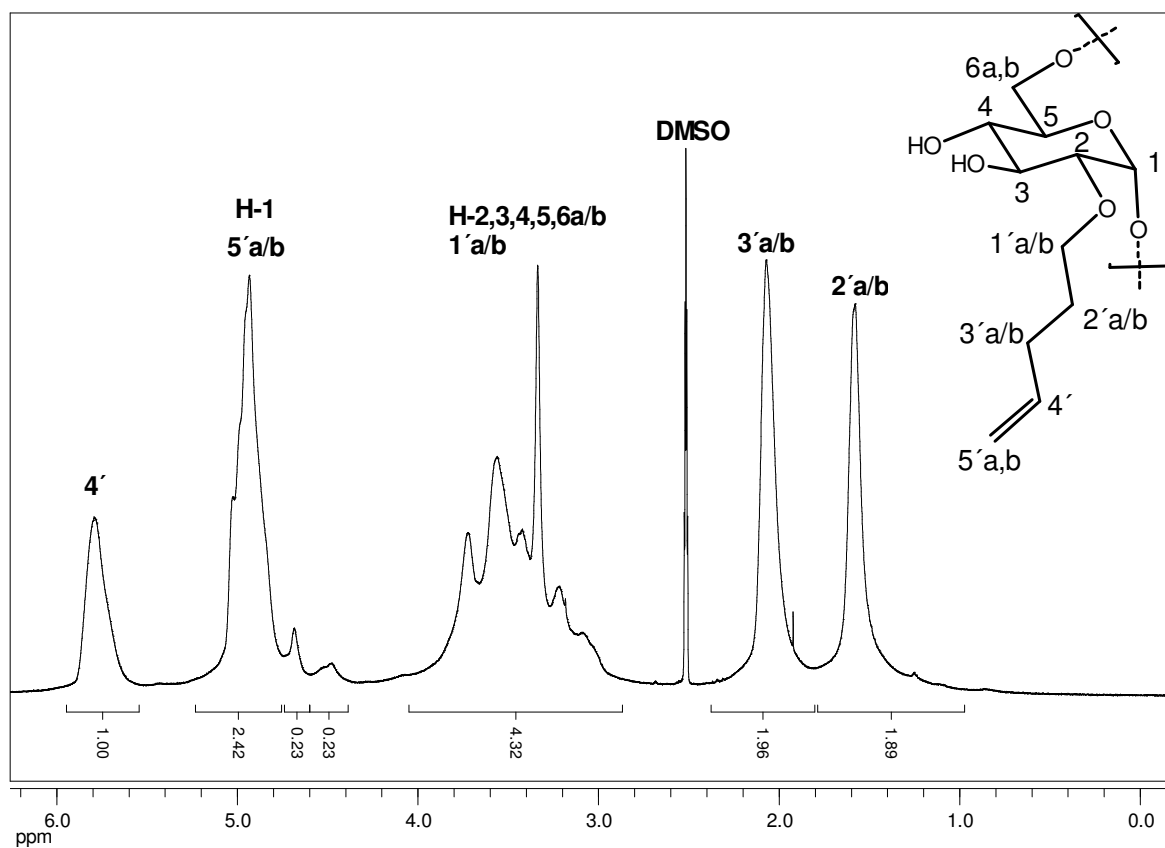


Abb. 6-44 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) von Pentenyldextran AV 90, DS 0.67 (GC) bzw. 1,14 (NMR).

6.4.1.4 Bestimmung des Monomermusters mittels Gaschromatographie

Auch Pentenylether zeigten in wässriger saurer Lösung Nebenreaktionen, die zu einer großen Signalvielfalt in den Gaschromatogrammen führten. Daher wurden auch diese Derivate mittels Methanolyse zu Monomeren abgebaut und anschließend die Pentenylgruppen mit H_2/PdC zu den korrespondierenden Pentylethern hydriert. Nach TFA-Hydrolyse und Reduktion mit NaBD_4 wurden die freien OH-Gruppen im letzten Schritt abweichend von der Derivatisierung von Allyldextranen acetyliert statt propionyliert. (partiell pentylierte Sorbitacetate). In diesem Fall wird die Retentionszeit durch die größeren Alkylsubstituenten stärker beeinflusst als durch die Acylgruppen. Die Reihenfolge der Elution bezogen auf Pentenyl ist hier un-, 2/3, 4, 23, 34/24, 234 (DB 1 Säule, siehe Abb. 6-45) bzw. un-, 3, 2, 4, 23/34, 24, 234 (DB 5 Säule).

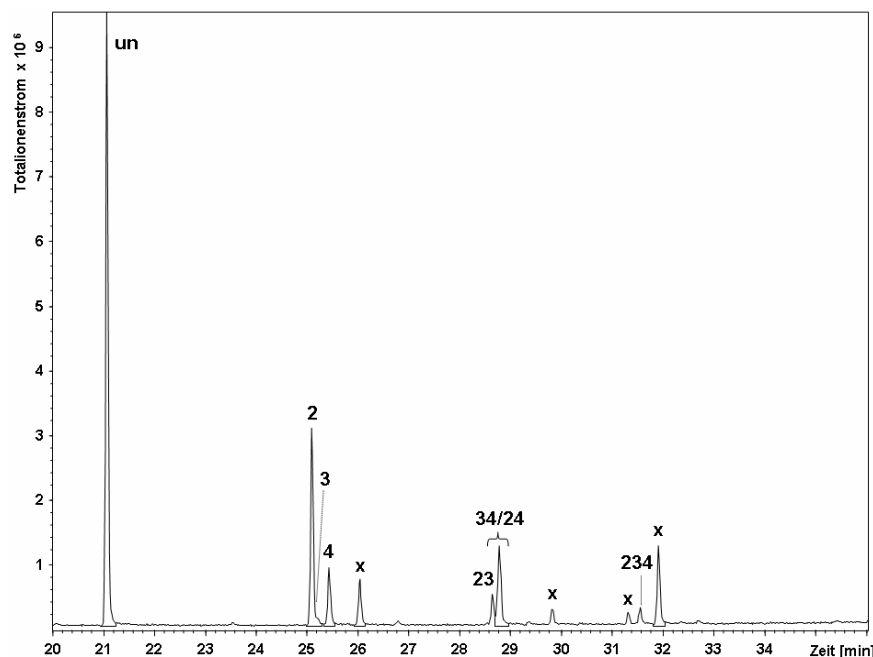


Abb. 6-45 Gaschromatogramm von **Pentenyl-dextran AV 90** (DS = 0,67), Säule: DB 1, Trägergas: Helium, Temperaturprogramm: 60 °C(1 min)- 20 °C/min 130 °C-4 °C/min 290 °C (30 min), x = Nebenprodukte (z.B. nicht reduzierte Derivate).

Die Regioselektivität der Pentenyl-Substitution von Dextran zeigt sich an den partiellen DS-Werten x_i , die in der Reihenfolge $x_2 > x_4 > x_3$ wie bei den Allyldextranen abnehmen. Prozentual verteilen sich die Substituenten im Durchschnitt zu 50 % auf C-2, 18 % auf C-3 und 32 % auf C-4. Derivate mit Substitution in C-6 wurden bei den Pentenyldextranen nicht beobachtet. Die erhaltenen Gaschromatogramme sind von der Trennleistung deutlich

schlechter als die der Allyldextranprodukte, so dass 2/3 und 34/24 (DB 1 Säule, siehe Abb. 6-45) bzw. 23/34 (DB 5 Säule) nicht getrennt wurden. Ihr Verhältnis wurde anhand der Ionenspuren im GC-MS abgeschätzt. Außerdem traten Nebenprodukte wie nicht reduzierte Derivate auf.

Die Substituentenverteilungen von AV 90 (5 Äq./OH 5-Br-1-penten, NaOH) und AV 91 (3 Äq./OH 5-Br-1-penten, NaOH) sind in Abb. 6-46 dargestellt. Der c_1 -Anteil stellt die größte Fraktion. Hier überwiegt C-2 Substitution deutlich. Bei den disubstituierten Derivaten ist die Selektivität nivelliert. Hierin hat 24-Pentenyl nur knapp den größten Anteil. Trisubstitution wurde überraschenderweise im Vergleich zu Allyldextranen nur sehr wenig nachgewiesen.

Ein Vergleich des Substitutionsmusters mit dem statistischen Modell wurde bei den Pentenyldextranen nicht durchgeführt, da die Daten hierfür aufgrund der erwähnten Nebenreaktionen nicht ausreichend belastbar sind. Für Pentenyldextrane müssen zudem weitere Daten auch in Hinblick auf die Oligomeranalytik und somit die Substituentenverteilung entlang der Polymerketten gesammelt werden, um diese Substanzklasse genauer einschätzen zu können.

Zusammenfassend sind Pentenyldextrane aufgrund ihrer besseren Löslichkeitseigenschaften vielversprechende Kandidaten für weitergehende Funktionalisierungen der Alkenylgruppen. Die gaschromatographische Analytik des Monomermusters sollte weiter optimiert werden. Zudem sollten die mit Li-Dimsyl homogen synthetisierten Pentenyldextrane sorgfältig charakterisiert werden, um diese alternative Syntheseroute bewerten zu können.

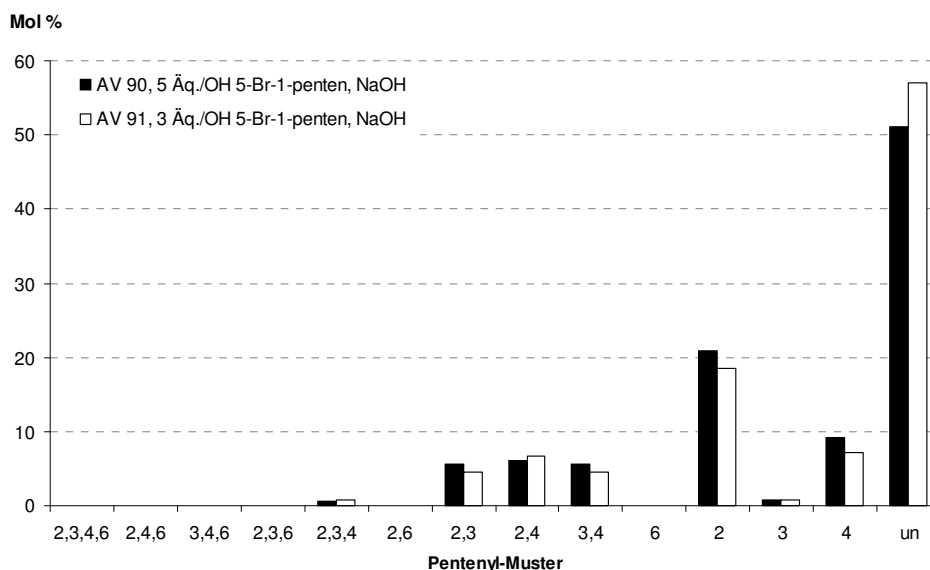


Abb. 6-46 Monomermuster der Pentenyldextrane AV 90 (DS 0.67) und AV 91 (DS 0.60).

6.5 Vergleich von Pentenyldextran mit Pentenylamylose

Analog den Allyldextranen und –amylosen (siehe Abschnitt 6.2) wurde parallel zu den Pentenyldextranen auch Amylose (*Sigma type III from potato*) pentenyliert. Die Charakterisierung erfolgte mittels Elementaranalyse, ATR-IR-Spektroskopie und Gaschromatographie. Aufgrund der Signalvielfalt im Gaschromatogramm durch Verunreinigungen, erfolgt die Monomerauswertung nur semi-quantitativ durch Abschätzung der einzelnen Regioisomere.

Tab. 6-6 stellt die parallel geführten Pentenylierungen der Amylosen und Dextrane gegenüber. Wie auch bei den korrespondierenden Allylderivaten (Abschnitt 6.2) zeigt sich, dass Amylose bei gleichen Äquivalenten aufgrund der höheren Reaktivität der primären 6-OH-Gruppe in einem höheren Maße substituiert wird. Trotz größerer Reagenzmengen (5 Äquivalente 5-Br-1-penten pro OH) wurden die Glucane AV 90 und AV 92 dennoch nicht oder nur minimal (Dextrane) höher substituiert als die Ansätze mit 3 Äquivalenten Reagenz.

Tab. 6-6 Übersicht über parallel durchgeführte Pentenylierungen von Amylose (M_w 960 kDa) und Dextran (M_w 500 kDa). PS = Polysaccharid.

Ansatz Nr.	PS	Mw [kDa]	NaOH Äq./OH	5-Br-1-penten Äq./OH	DS GC
AV 91	Dextran	500	7,8	3,0	0,60
AV 93	Amylose	960	7,8	3,0	1,54
AV 90	Dextran	500	13,6	5,0	0,67
AV 92	Amylose	960	13,6	5,0	0,98

Abb. 6-47 zeigt die ATR-IR-Spektren einer Pentenylamylose im Vergleich zu Pentenyldextran. Beide Pentenyl-Glucane zeigen verbliebene OH-Streck-Schwingungen bei $3200\text{--}3570\text{ cm}^{-1}$ der unsubstituierten Hydroxygruppen. Die C=C-Valenzschwingung der Pentenylgruppen liegen bei 1639 cm^{-1} , die =C-H-Valenzschwingung bei 3072 cm^{-1} , die C=C-H-Deformationsschwingungen bei 1022 und 906 cm^{-1} sowie die C-O-C-Deformationsschwingung der Ether bei 1092 cm^{-1} . Lediglich die verschiedenen C-H-Deformationsschwingungen der Amylose und des Dextrans bei $1300\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ sind etwas unterschiedlich. Die Intensitäten der Pentenyl-Banden ist sehr ähnlich, was auf einen vergleichbaren DS hindeutet. Die mit den genannten Einschränkungen aus GC-Analysen erhaltenen Werte für die Substitutionsgrade (Dextran 0,6 vs. Amylose 1,5) werden im ATR-IR nicht bestätigt.

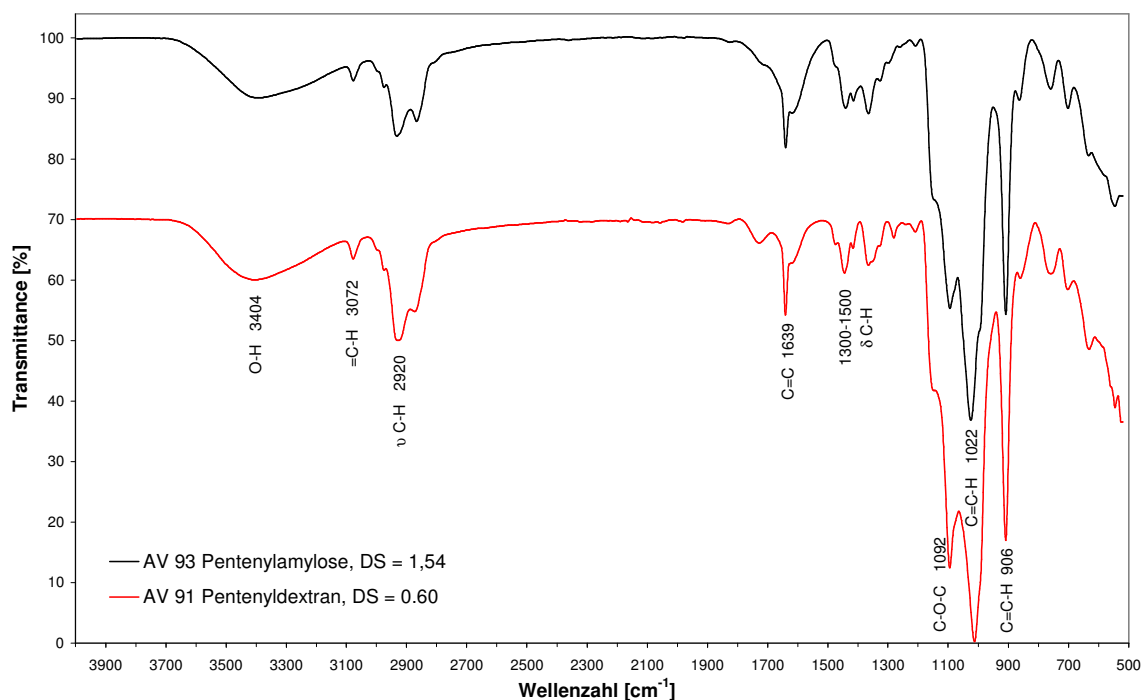


Abb. 6-47 ATR-IR-Spektren von Pentenylamylose (DS 1.54) und Pentenyldextran (DS 0.60).

Die Regioselektivität der Pentenylierung in Amylose erfolgte näherungsweise in der Reihenfolge 2 (49 %) > 3 (26 %) ≥ 6 (25 %) (siehe Tab. 6-7). Die disubstituierte Fraktion (c_2) hatte in beiden untersuchten Pentenylamylosen, abgesehen von c_0 , den größten Anteil am Monomermuster.

Zum Vergleich mit statistischen Modellen und der Einschätzung der Heterogenität H_I sind die aus der GC-Analytik abgeschätzten Monomerdaten auch bei den Pentenylamylosen nicht ausreichend belastbar. Die Amylose erweist sich jedoch auch bei der Pentenylierung als besser zugänglich, worauf der deutlich höhere DS-Wert bei gleichen Äquivalenten an Reagenzien schließen lässt.

Tab. 6-7 Vergleich der Pentenylmonomermuster von Pentenyldextranen und Pentenylamylosen.

	Pentenyl- Dextran AV 90	Pentenyl- Dextran AV 91	Pentenyl- Amylose AV 92	Pentenyl- Amylose AV 93
c_0	51,1	57,0	49,8	22,9
c_1	30,9	26,5	11,0	13,0
c_2	17,4	15,8	30,4	51,0
c_3	0,6	0,7	8,9	13,2
x_2	0,33	0,30	0,48	0,69
x_3	0,13	0,11	0,25	0,46
x_4	0,22	0,19		
x_6			0,25	0,39
DS	0,67	0,60	0,98	1,54

6.6 Morphologie der Polysaccharidderivate

Von ausgewählten Produkten wurden Scanning Electron Microscopy (SEM) Aufnahmen angefertigt. Um einen möglichen Einfluss der Aufarbeitung (Dialyse, Gefriertrocknung) auf die Strukturbildung aufzuzeigen oder auszuschließen, wurden auch die unmodifizierten Dextrane direkt wie erhalten sowie nach Gefriertrocknung einer wässrigen bzw. einer dialysierten DMSO-Lösung untersucht.

Beispielhaft sind in Abb. 6-48 SEM-Aufnahmen von unbehandeltem Dextran M_w 500 kDa, nach Lösen desselben in Wasser und Gefriertrocknung und nach Lösen in DMSO, Dialyse

und Gefriertrocknung sowie der Polysaccharidderivate Allyldextran AV 159 (M_w 40 kDa, DS 2,05, NaOH), Allyldextran AV 170 (M_w 15-25 kDa, DS 0,86, Li-Dimsyl), Allylstärke AV 88 S (DS 2,21), Pentenyldextran AV 91 (M_w 500 kDa, DS 0,60) und Methyldextran SL-08-5 (DS 0,56, M_w 40 kDa) gezeigt.

Die sphärische Struktur des unbehandelten Dextrans (Abb. 6-48, A) ist typisch für Produkte, die sprühgetrocknet wurden. Das Dextran nach Lösen in Wasser (B) oder DMSO (C) und anschließender Gefriertrocknung zeigt neben den überwiegenden sphärischen Strukturen auch einige zylindrische oder blattartige Morphologien.

Bei den SEM-Bildern der Allylstärke und der Dextranderivate (Abb. 6-48, D-H) sind verschiedene Geometrien erkennbar: sphärische und vesikelartige, zylindrische und/oder flache, blattartige Strukturen. Diese verschiedenen Morphologien könnten in Zusammenhang mit den hydrophil-hydrophoben Eigenschaften der Dextranderivate stehen, welche abhängig vom DS und der Heterogenität des Materials sind. Bei der Dialyse im schlechten Lösungsmittel Wasser könnten sich im heterogenen und flexiblen Probenmaterial durch Selbstorganisation Aggregate ähnlicher Polarität bilden, welche angelehnt an das Konzept des Packungsparameters^[232] (Verhältnis des Volumens zur Größe der Grenzfläche hydrophil/hydrophob) zu sphärischen, zylindrischen oder laminaren geometrischen Formen führen. Diese könnten durch Gefriertrocknung fixiert erhalten bleiben. Ob bei steigender Substitution der polaren OH-Gruppen mit lipophilen Alkyl/Alkenylethern ein Zusammenhang mit der vermehrten Ausbildung bestimmter Geometrien besteht, sollen zukünftige Untersuchungen zeigen.

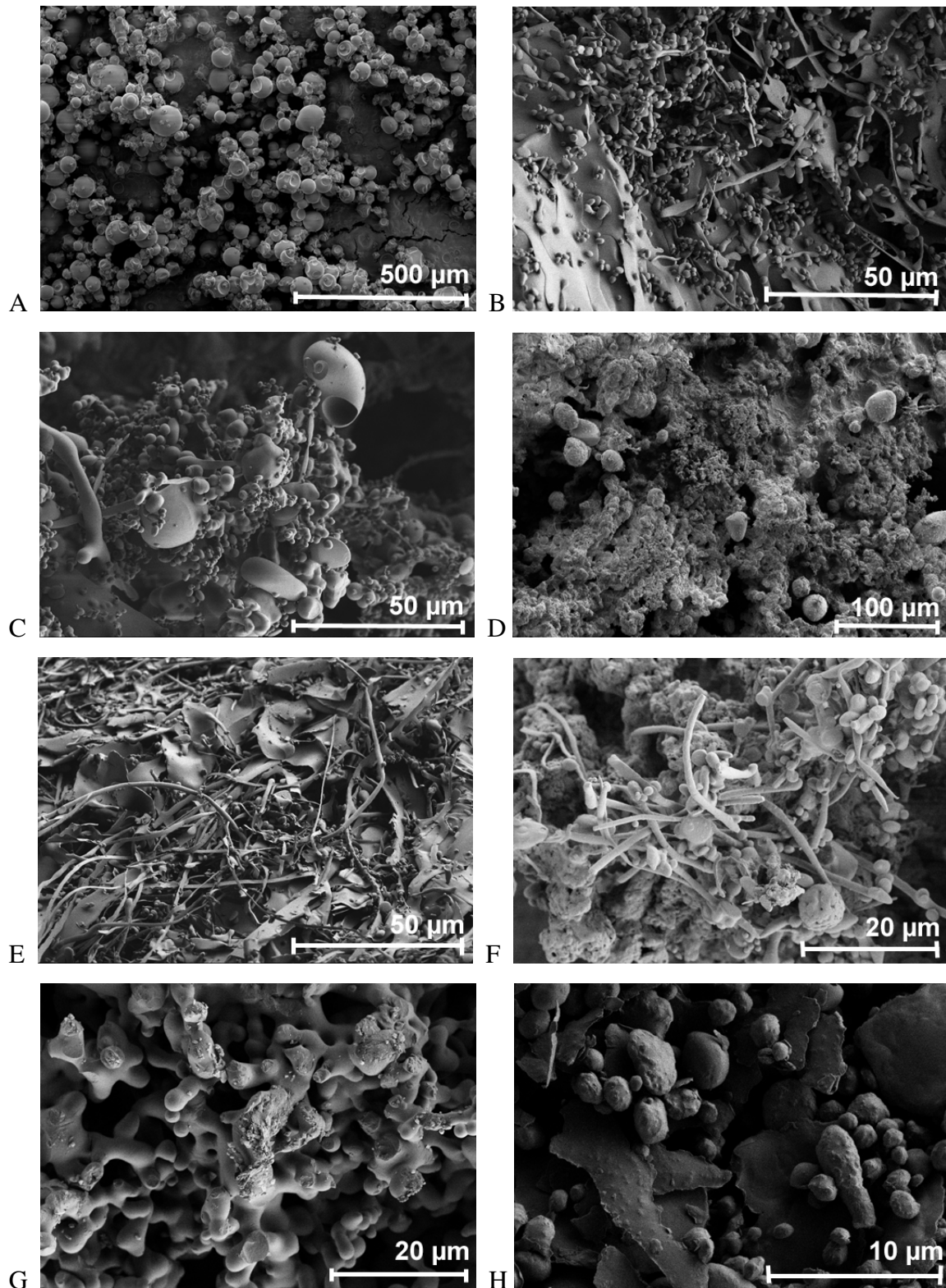


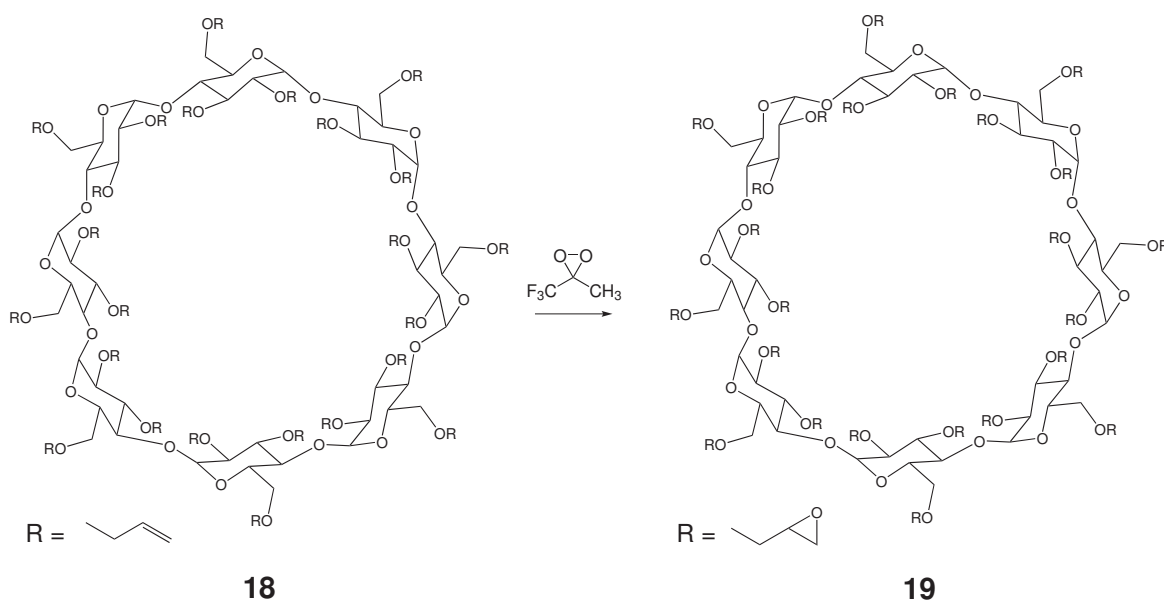
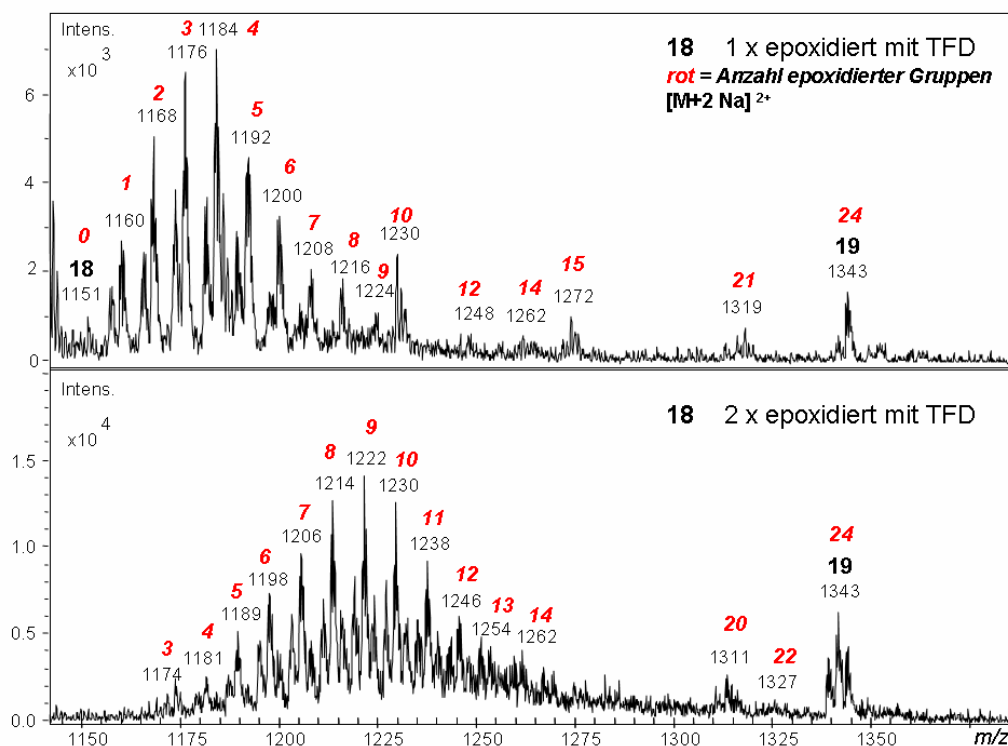
Abb. 6-48 **SEM Aufnahmen von Polysaccharidderivaten.** **A:** Dextran M_w 500 kDa unbehandelt. **B:** Dextran M_w 500 kDa in Wasser gelöst und gefriergetrocknet, **C:** Dextran M_w 500 kDa in DMSO gelöst, dialysiert und gefriergetrocknet, **D:** Allylstärke AV 88S (DS 2,21), **E:** Allyldextran AV 170 (M_w 15-25 kDa, DS 0,86), **F:** Allyldextran AV 159 (M_w 40 kDa, DS 2,05), **G:** Pentenyldextran AV 91 (M_w 500 kDa, DS 0,67), **H:** Methyl dextran SL-08-5 (M_w 40 kDa, DS 0,56).

6.7 Epoxidierung und nucleophile Ringöffnung als polymeranaloge Reaktionen

6.7.1 Epoxidierung von Octakis[2,3,6-tri-*O*-allyl]- γ -cyclodextrin

Die an der Monomer-Modellsubstanz **3** erfolgreiche Reaktionssequenz Epoxidierung/*N*-nucleophile Ringöffnung (siehe Abschnitte 4.3 und 4.5) sollte auf Polysaccharide übertragen werden. Wegen der oft unzureichenden Lösungseigenschaften der Allyldextrane wurde zunächst versucht, die optimierten Bedingungen der Epoxidierung mit (Trifluormethyl)methyldioxiran (TFD) auf ein definiertes *O*-Allyl-glucooligomer anzuwenden. Hierzu wurde Octakis[2, 3, 6-tri-*O*-allyl]- γ -cyclodextrin (**18**) verwendet (siehe Abb. 6-49), welches eine sehr gute Löslichkeit in Dichlormethan aufweist und von Dr. A. Bösch freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde^[3].

Der Versuchsaufbau wurde wie in Abb. 4-7 dargestellt mit KHSO₅ und Trifluoraceton zur Erzeugung des reaktiven Agens TFD gestaltet. Das Allylcyclodextrin **18** wurde hierbei in Dichlormethan (3,4 mg/mL) vorgelegt. Nach Abnahme einer Probe wurde der verbliebene Rest ein zweites Mal in der Apparatur mit TFD epoxidiert. Die dünnschichtchromatographische Analyse der farblosen und öligen Substanz zeigte, dass eine Reaktion des Cyclodextrins **18** zu mehreren stärker polaren γ -Cyclodextrin-Derivaten erfolgt war. Die Epoxidierung eines Teils der Allylgruppen konnte bei ESI-MS-Messungen durch das Auftreten hierzu passender *m/z*-Signale ($[M+2 Na]^{2+}$ bzw. $[M+2 K]^{2+}$) mit 0 (**18**) bis 24 (**19**) Epoxygruppen je Cyclodextrinmolekül bestätigt werden. Durch die Größe der Moleküle (**19**: C₁₂₀H₁₇₆O₆₄) und daraus resultierend die hohe Anzahl an Isotopenpeaks werden die einzelnen Signale im ESI-Massenspektrum nicht mehr scharf aufgelöst (siehe Abb. 6-50).


Abb. 6-49 Epoxidierung von γ -Allylcyclodextrin (**18**) mit TFD:

Abb. 6-50 ESI-MS von γ -Allylcyclodextrin (**18**) nach einfacher (oben) bzw. zweifacher (unten) Epoxidierung mit TFD. Rot = Anzahl epoxidierter Gruppen.

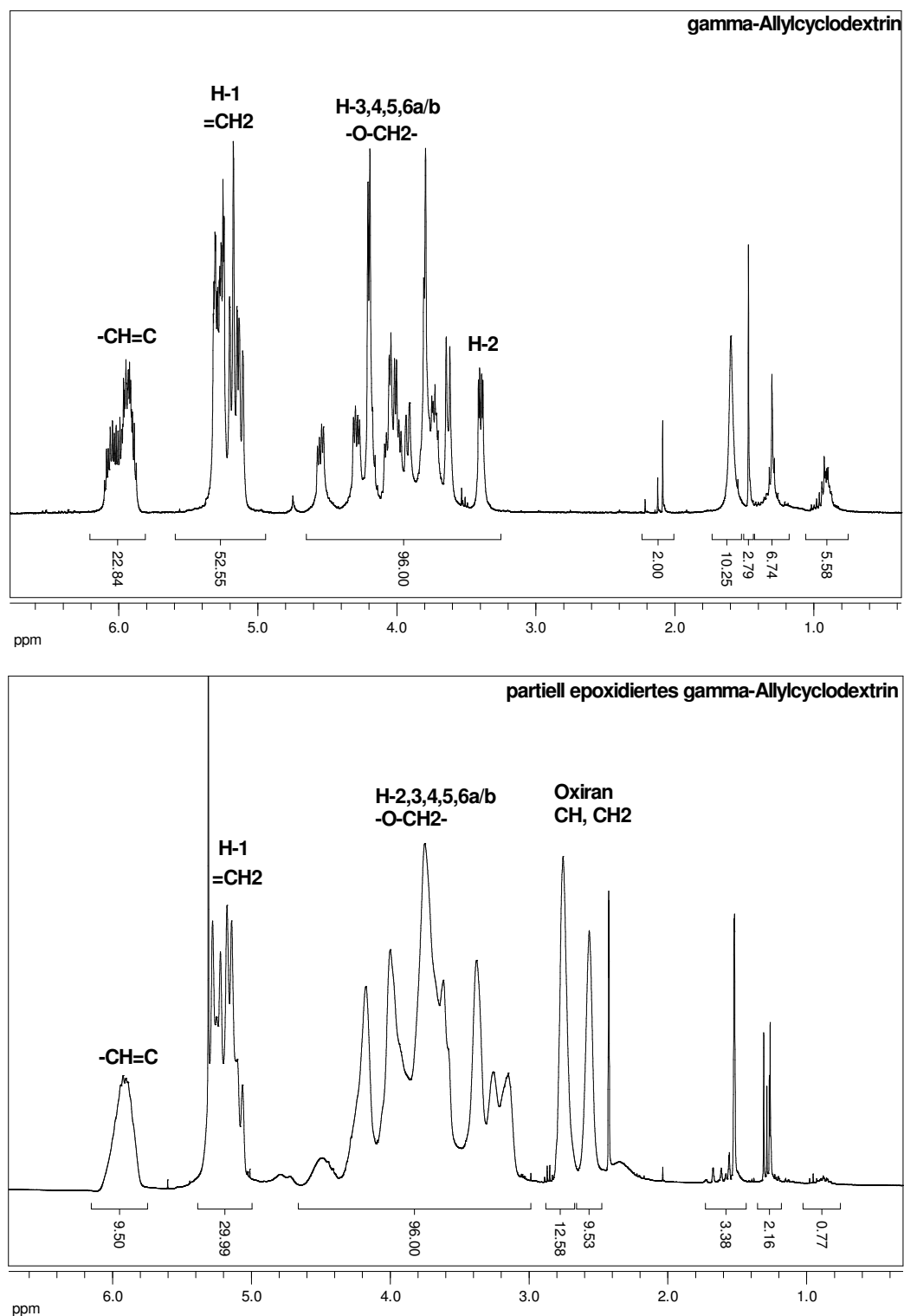


Abb. 6-51 ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, CDCl_3 + TMS), oben: γ -Allylcyclodextrin (**18**), unten: mit TFD zweimal epoxidiertes γ -Allylcyclodextrin (**18**) (Rohprodukt).

Das von dem erhaltenen Produktgemisch aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 6-51) wies im Vergleich zum Edukt **18** neue Resonanzen im Bereich von 2,55 bis 2,75 ppm auf,

wie sie für Oxiran-Protonen auch bei den Glucose-Modellsubstanzen **5** und **6** beobachtet wurden. Die Intensitäten der Allyl-Protonen (5,25 bzw. 5,80 ppm) ist dagegen bei Normierung der Zucker-(H-2 bis -6) und Ether-Methylenprotonen (3,1-4,8 ppm) auf 96 H auf etwa 50 % gesunken, was für einen deutlichen Umsatz (etwa 50 %) der Allylether spricht. Da die Epoxidierung jedoch nicht mit 100 % Umsatz abgelaufen ist, wird neben dem vollständig epoxidierten Octakis[2, 3, 6-tri-*O*-(2,3-epoxypropyl)]- γ -cyclodextrin (**19**) ein komplexes Produktspektrum an Isomeren erhalten. Eine Isolierung einzelner Isomere zur weiteren Charakterisierung war daher nicht möglich.

Es konnte mit der Reaktion an der Modellsubstanz Octakis[2, 3, 6-tri-*O*-allyl]- γ -cyclodextrin (**18**) gezeigt werden, dass sich die Epoxidierung mit TFD prinzipiell auch für höhermolekulare *O*-Alkenyl-Glucosederivate eignet.

6.7.2 Epoxidierung und nucleophile Ringöffnung von Allyldextranen

Bei ersten Versuchen zur Epoxidierung von Allyldextranen mit *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) in verschiedenen Lösungsmitteln (Dichlormethan oder wässrige NaHCO₃-Lösung) konnte kein Angriff auf die Allylgruppen beobachtet werden.

Tab. 6-8 Übersicht über die Epoxidierungsversuche von Allyldextranen.

Nr.	Allyldextran Edukt (DS)	Reagenz	Äq./ allyl	LM	T [°C]	t [h]	U [%]
AV 34	AV 31 (0,33)	<i>m</i> -CPBA	1,1	NaHCO ₃ (aq)	0-20	96	0 ³⁾
AV 40	AV 8 (0,60)	<i>m</i> -CPBA	1,7	CH ₂ Cl ₂	20	70	0 ³⁾
AV 78	AV 24 (0,57)	DMD ¹⁾	-	Aceton	-7 /RT	2/12	0 ^{3,4)}
AV 79	AV 8 (0,60)	DMD ¹⁾	-	Aceton	-7/RT	2/12	0 ^{3,4)}
AV 164	AV 159 (2.05)	TFD ²⁾	-	DMSO	20	2,5	5 ³⁾
AV 166	AV 159 (2.05)	TFD/DMD ²⁾	-	CH ₂ Cl ₂	7	3	5 ³⁾

LM = Lösungsmittel, U = Umsatz, 1) *in situ* gebildet, 2) *in situ* gebildet und übergetrieben in Apparatur, 3) abgeschätzt mittels ATR-IR, 4) abgeschätzt mittels GC und ESI-MS nach Abbau zu Monomeren

Daher wurde Allyldextran AV 159 (DS = 2,05) in der für die Modellmonomere **3** und **4** bewährten Versuchsanordnung (siehe Abb. 4-7) zum einen in Dichlormethan, zum anderen in DMSO mit *in situ* generiertem DMD bzw. TFD epoxidiert (siehe Tab. 6-8 und Abb. 6-52). Die Reaktionsansätze wurden daraufhin geteilt. Die eine Hälfte wurde isoliert (Einengen oder Dialyse), die zweite ggf. etwas eingengt und mit Cysteamin in DMSO mehrere Tage bei erhöhter Temperatur gerührt (Tab. 6-9). Letztere wurden anschließend neutralisiert und die Produkte durch Dialyse und Gefriertrocknung isoliert.

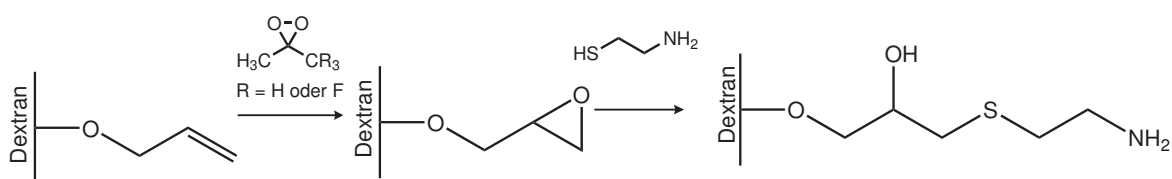


Abb. 6-52 Epoxidierung von Allyldextranen und nucleophile Ringöffnung durch Cysteamin.

Tab. 6-9 Nucleophile Ringöffnung von *O*-(2,3-Epoxypropyl)-Dextranen. LM = Lösemittel.

Nr.	Allyldextran Edukt (DS)	S-Nuc	Äq./ Substituent	LM	T [°C]	t [d]
AV 165	AV 159 (2.05)	Cysteamin	3	DMSO	60	3
AV 167	AV 159 (2.05)	Cysteamin	3	CH ₂ Cl ₂	33	7

Abb. 6-53 zeigt die ATR-IR Spektren der erhaltenen Produkte nach der Epoxidierung bzw. *S*-nucleophilen Ringöffnung des Allyldextrans AV 159 (DS = 2,05). Schwingungen der Epoxygruppe liegen bei ~1250, 900 und 800 cm⁻¹. Diese Banden finden sich mit schwacher Ausprägung bei dem epoxidierten Produkt AV 166. Alle Dextrane zeigen die bekannte Schwingungen der Allylgruppe bei 3075 (w) und 1640 cm⁻¹ (m). Jedoch ist deren Intensität bei den epoxidierten Produkten AV 164 und AV 166 sowie dem anschließend mit Cysteamin behandelten Dextran AV 167 etwas vermindert. Signale der Aminogruppe um 3500-3300 (m) (zwei Banden, N-H-Valenzschwingungen) können nicht beobachtet werden. Allerdings werden diese durch die breiten OH-Schwingungen um 3400 cm⁻¹ überlagert.

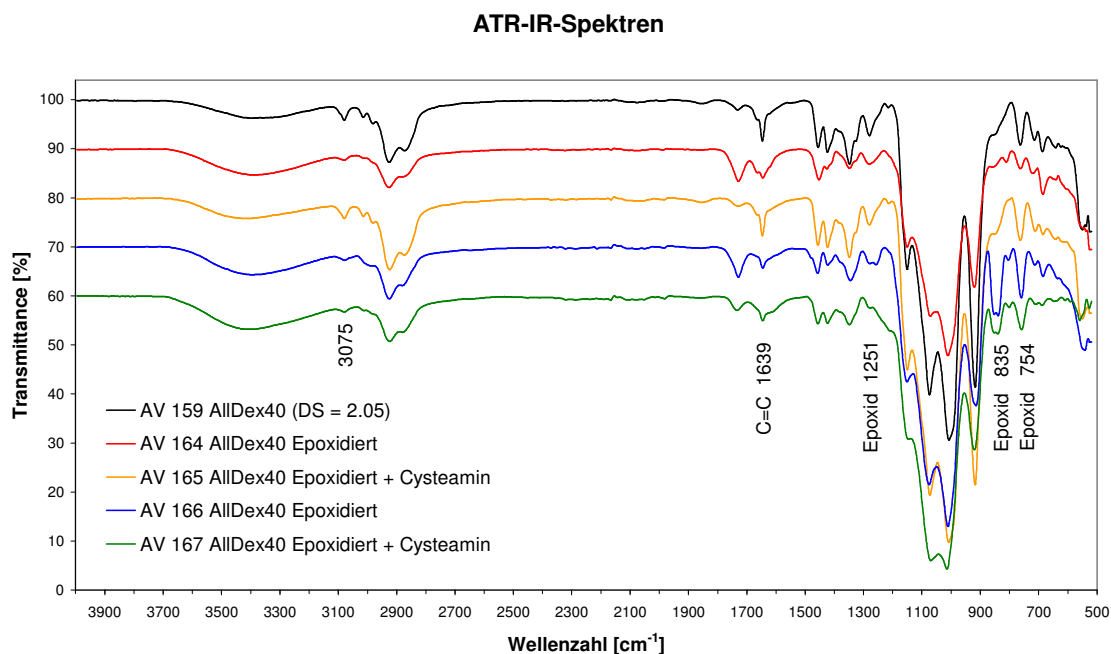


Abb. 6-53 ATR-IR Spektren der Epoxidierungs- und nucleophilen Ringöffnungsprodukte (Cysteamin) von Allyldextran AV 159 (DS_{allyl} = 2,05).

Die epoxidierten sowie die zusätzlich mit Cysteamin behandelten Allyldextrane wurden elementaranalytisch untersucht, um über den Anteil der eingeführten Heteroatome einen Anhaltspunkt für den Umsatz zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Tab. 6-10 gegenüber gestellt. Bei den epoxidierten Produkten sind die C- und H-Anteile leicht verringert, was auf eingeführten Sauerstoff zurückgeführt werden kann. Aus dem Massenanteil für Stickstoff der mit Cysteamin behandelten Produkte lässt sich der Substitutionsgrad grob einschätzen nach folgender Gleichung:

$$DS_{\text{Cysteamin}} = \frac{n(\text{N}) [\text{mol}/100\text{g}]}{n(\text{AGU}) [\text{mol}/100\text{g}]} \quad (17)$$

Für diesen Fall gilt

$$\begin{aligned} n(\text{AGU}) [\text{mol}/100\text{g}] &= \frac{n(\text{C}) [\text{mol}/100\text{g}] - 2 \cdot n(\text{N}) [\text{mol}/100\text{g}]}{(\text{Anzahl } C_{\text{AGU}} + DS_{\text{allyl}} \cdot 3)} \\ &= \frac{n(\text{C}) [\text{mol}/100\text{g}] - 2 \cdot n(\text{N}) [\text{mol}/100\text{g}]}{12,15} \end{aligned} \quad (18)$$

Tab. 6-10 Ergebnisse der Elementaranalyse von den epoxidierten und nucleophil mit Cysteamin geöffneten Produkten von Allyldextran AV 159 (DS 2.05).

		Edukt	AV 164	AV 165	AV 166	AV 167
		Allyldextran	Allyldextran	AV 164 +	Allyldextran	AV 166 +
		DS 2.05	Epoxidiert	Cysteamin	Epoxidiert	Cysteamin
C	[w-%]	58,66	58,24	59,69	54,09	54,21
H	[w-%]	7,13	7,26	7,36	6,65	6,90
N	[w-%]	-	-	0,38	-	0,44
S	[w-%]	-	-	1,34	-	1,06
Rest O	[w-%]	34,21	34,50	31,23	39,26	37,39
C	[mol/100g]	4,88	4,85	4,97	4,50	4,51
H	[mol/100g]	7,07	7,20	7,30	6,60	6,85
N	[mol/100g]	-	-	0,03	-	0,03
S	[mol/100g]	-	-	0,04	-	0,03
Rest O	[mol/100g]	2,14	2,16	1,95	2,45	2,34
DS	Cysteamin			0,07		0,08

Die molaren Gehalte an Stickstoff und Schwefel sind erwartungsgemäß (1:1) nahezu identisch. Jedoch sind die absoluten Werte äußerst gering, so dass sich ein Substitutionsgrad mit Cysteamin von nur 0,07 bzw. 0,08 ergibt. Dieses Ergebnis bedeutet, dass nur etwa 4 % der Allylsubstituenten umgesetzt wurden.

Nach Abbau zu den Monomeren konnten mittels ESI-MS-Messung keine Cysteamin-Addukte nachgewiesen werden, obgleich diese aufgrund ihrer Aminofunktion mit großer Intensität angezeigt werden sollten. Die Epoxidierung und nucleophile Ringöffnung von Allyldextranen bedarf daher noch weiterer Optimierung der Bedingungen, um auf diesem Wege Aminodextrane mit höherem Substitutionsgrad zu erhalten.

Um den Schritt der Epoxidierung zu umgehen, wurde versucht, Cysteamin direkt durch eine radikalische Addition an die Allylether zu binden. Die erzielten Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt erläutert.

6.8 Radikalische Thioladdition als polymeranaloge Reaktion

Als Alternative zur nucleophilen Ringöffnung der Epoxide wurde versucht, Cysteamin über einer radikalische Thioladdition (siehe Kapitel 3.3.3) direkt an das Allyldextran zu binden. Vera *et al.* berichteten über einen 100 %igen Umsatz eines Allyldextrans mit Cysteamin zum Aminodextran, welchen sie mittels Trinitrobenzolsulfonat-Assay (TNBS)

bestimmten^[233]. Als Katalysator wurde zum einen wie in der erwähnten Literatur Ammoniumpersulfat $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, und zum anderen Azoisobutyronitril (AiBN) als Radikalstarter eingesetzt (siehe Tab. 6-11 und Abb. 6-54). Nach erfolgter Reaktion wurden die Dextrane durch Dialyse isoliert und gefriergetrocknet.

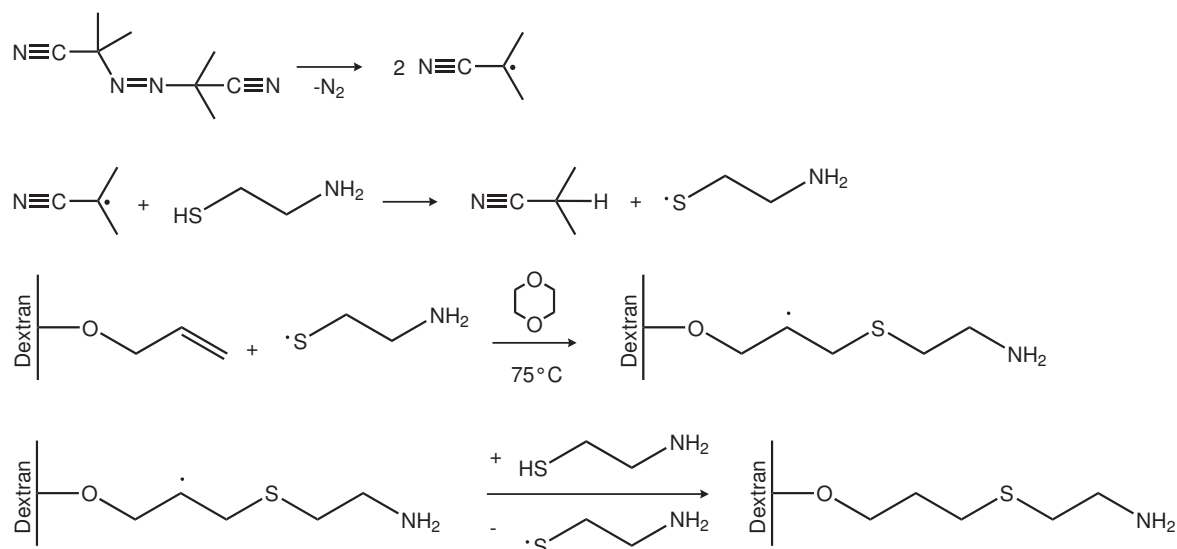


Abb. 6-54 Mechanismus der radikalischen Thioladdition von Cysteamin an Allyldextrane, Startreaktion durch AiBN.

Tab. 6-11 Übersicht über die radikalische Thioladdition von Cysteamin an Allyldextrane.

Nr.	Allyldextran Edukt (DS)	Cysteamin Äq./allyl	Kat (Äq./allyl)	LM	T [°C]	t [h]
AV 168	AV 159 (2.05)	1,9	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (0,25)	DMSO	50	72
AV 169	AV 159 (2.05)	19,0	AiBN (0,17)	1,4-Dioxan	75	21

Abb. 6-55 zeigt die ATR-IR Spektren der erhaltenen Produkte nach Behandlung des Allyldextrans (DS = 2,05) mit Cysteamin und Katalysator. Beide Produkte zeigen lediglich eine verringerte Intensität für die Schwingungen der Allylgruppe bei 3072 (w) und 1641 cm^{-1} (m).

Die Elementaranalyse (siehe Tab. 6-12) zeigt im Vergleich zur Epoxidierung und nucleophilen Ringöffnung (siehe 6.7.2) einen höheren Gehalt an Stickstoff und Schwefel. Nach Gleichung (17) und (18) (s.o.) lässt sich der $\text{DS}_{\text{Cysteamin}}$ abschätzen zu 0,12

(Ammoniumpersulfat-Katalyse) bzw. 0,26 (AiBN), was einem Umsatz von 6 % (Ammoniumpersulfat) bzw. 13 % (AiBN) der Allylether entspricht. Diese Reaktion war im Vergleich zur Epoxidierung/nucleophilen Ringöffnung (4 % Umsatz) somit etwas erfolgreicher.

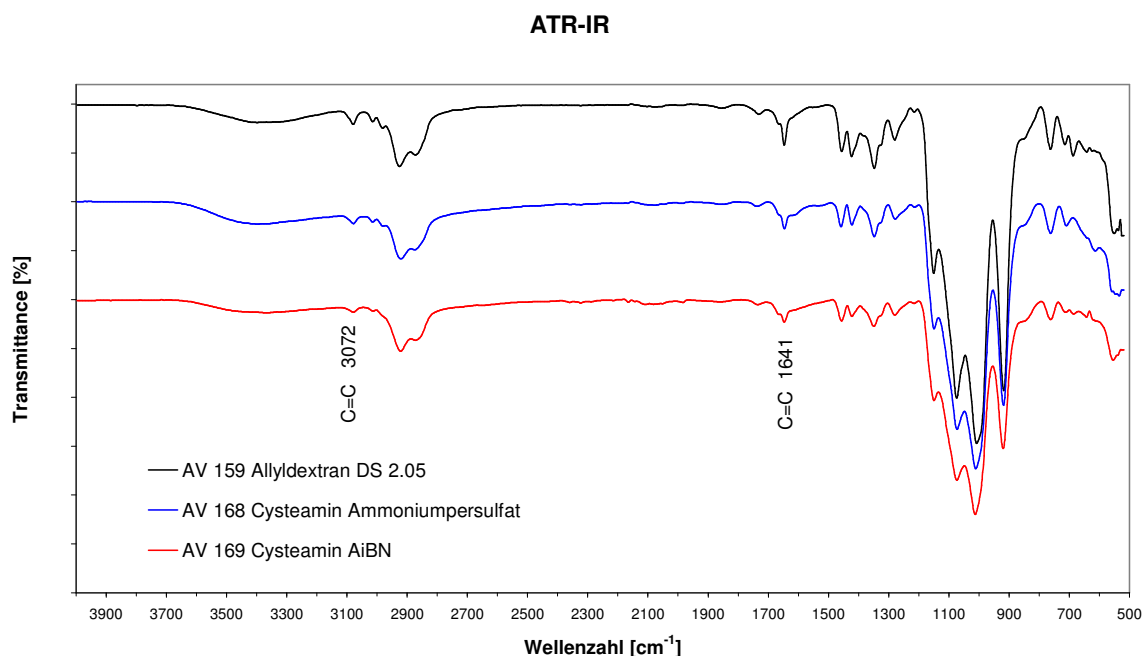


Abb. 6-55 ATR-IR Spektren der Reaktionsprodukte von Allyldextran AV 159 ($DS_{\text{allyl}} = 2,05$) mit Cysteamine unter Katalyse von Ammoniumpersulfat bzw. AiBN.

Tab. 6-12 Ergebnisse der Elementaranalyse der radikalischen Thioladdition von Cysteamine an Allyldextran.

		Edukt	AV 168	AV 169
		Allyldextran	Cysteamine	Cysteamine
		DS 2.05	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	AiBN
C	[w-%]	58,66	59,10	58,11
H	[w-%]	7,13	7,35	7,68
N	[w-%]	-	0,68	1,41
S	[w-%]	-	2,02	3,33
Rest O	[w-%]	34,21	30,85	29,47
C	[mol/100g]	4,88	4,92	4,83
H	[mol/100g]	7,07	7,29	7,62
N	[mol/100g]	-	0,05	0,10
S	[mol/100g]	-	0,06	0,10
Rest O	[mol/100g]	2,14	1,93	1,84
DS	Cysteamine		0,12	0,26

Eine mögliche Ursache für die schlechte Reaktionseffizienz ist die unzureichende Löslichkeit der Allylhexane. Daher sollten zukünftig Funktionalisierungen der Doppelbindung an den homologen und besser zugänglichen Pentenylhexanen durchgeführt werden, um auf diese Weise Aminohexane zu erhalten.

7 Methylhextrane

Die im Rahmen dieser Arbeit mit Li-Dimsyl synthetisierten *O*-Alkenyldextrane zeigten eine unerwartet starke Abweichung von einer statistischen Verteilung der Substituenten (siehe Kapitel 6.1.2.6 und 6.4.1.4). Die Ursache dieses Effektes findet sich vermutlich auf der makromolekularen Ebene. Um dieses genauer zu untersuchen, wurden die Studien auf die vergleichsweise einfachen Methylether der Dextrane ausgedehnt. Bei diesen Derivaten ist die quantitative Analytik auf verschiedenen strukturellen Ebenen weniger durch die Eigenschaften der Substituenten geprägt. Hier kann zudem auf für Methylpolysaccharide etablierte Oligomer-Analysemethoden^[197,207,211] zurückgegriffen werden. Einige Ergebnisse dieser Studie sind bereits veröffentlicht worden^[179].

7.1 Synthese von Methylhextranen

Die Synthese der Methylhextrane erfolgte analog der Alkenyldextrane mit NaOH oder Lithiumdimsyl (1,6 M) als Base und Methyljodid als Alkylierungsreagenz in DMSO. Dabei wurde das Molekulargewicht der Dextrane (15-500 kDa), die Konzentration des Dextrans in der Lösung sowie die Basen- und MeI-Äquivalente pro OH variiert (siehe Tab. 7-1). Nach erfolgter Reaktion wurden die partiell methylierten Dextrane dialysiert und gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurde ein Probenset mit einem Methyl-DS im Bereich von 0,48 bis 2,16 erhalten.

Tab. 7-1 Reaktionsbedingungen für die Synthese von Methylhextranen in DMSO mit Base / Methyljodid.

Nr.	M _w ¹⁾ [kDa]	Konz. ²⁾ [mg/mL]	Basenart	[Äq./OH]	t ³⁾ [min]	Ausbeute ⁴⁾ [% d. Th.]	DS AA ⁵⁾
MeD 1	40	25	NaOH	1,7	15	67	1,59
MeD 2	40	25	Li-Dimsyl	1,7	15	88	0,48
MeD 3	15-25	30	Li-Dimsyl	0,8	15	106	2,07
MeD 4	40	30	Li-Dimsyl	0,8	15	106	2,16
MeD 5	500	30	Li-Dimsyl	0,8	15	108	1,06
MeD 6	70	10	Li-Dimsyl	0,3	30	48	0,76
MeD 7	70	10	Li-Dimsyl	0,6	30	90	1,59
MeD 8	70	10	Li-Dimsyl	0,9	30	76	1,76
MeD 9	70	10	Li-Dimsyl	1,2	30	82	2,06

1) Herstellerangabe

2) Dextran in DMSO

3) Inkubationszeit mit Base

4) berechnet unter Berücksichtigung des DS-Wertes

5) Alditolacetat-Methode (GC) inklusive terminale x,6-*O*-Me

7.2 Strukturelle Charakterisierung von Methylhextranen

Die Monomeranalytik erfolgte gaschromatographisch nach Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung. Da auf diese Weise nicht alle Regioisomere getrennt werden konnten, wurde zusätzlich eine Methanolyse mit anschließender Silylierung oder Acetylierung der Hydroxygruppen durchgeführt. Durch Kombination dieser Methoden konnte die Monomerzusammensetzung vollständig bestimmt werden (siehe Abb. 7-1).

Die Reihenfolge der Substitution der OH-Gruppen war auch bei diesen Derivaten $O-2 > O-4 \geq O-3$, wobei die Bevorzugung von O-2 am ausgeprägtestens bei NaOH als Base (MeD 1) und bei geringen Mengen an Dimsyl (0,3 Äq./OH, MeD 6) war. Diese Ergebnisse stimmen mit den für Allyldextrane erhaltenen Ergebnissen überein (siehe Kapitel 6.1.2) und stehen zudem in Einklang mit den literaturbeschriebenen Werten für Methylhextrane von De Belder *et al.* ($k_2 : k_3 : k_4 = 8 : 1 : 3,5$)^[181].

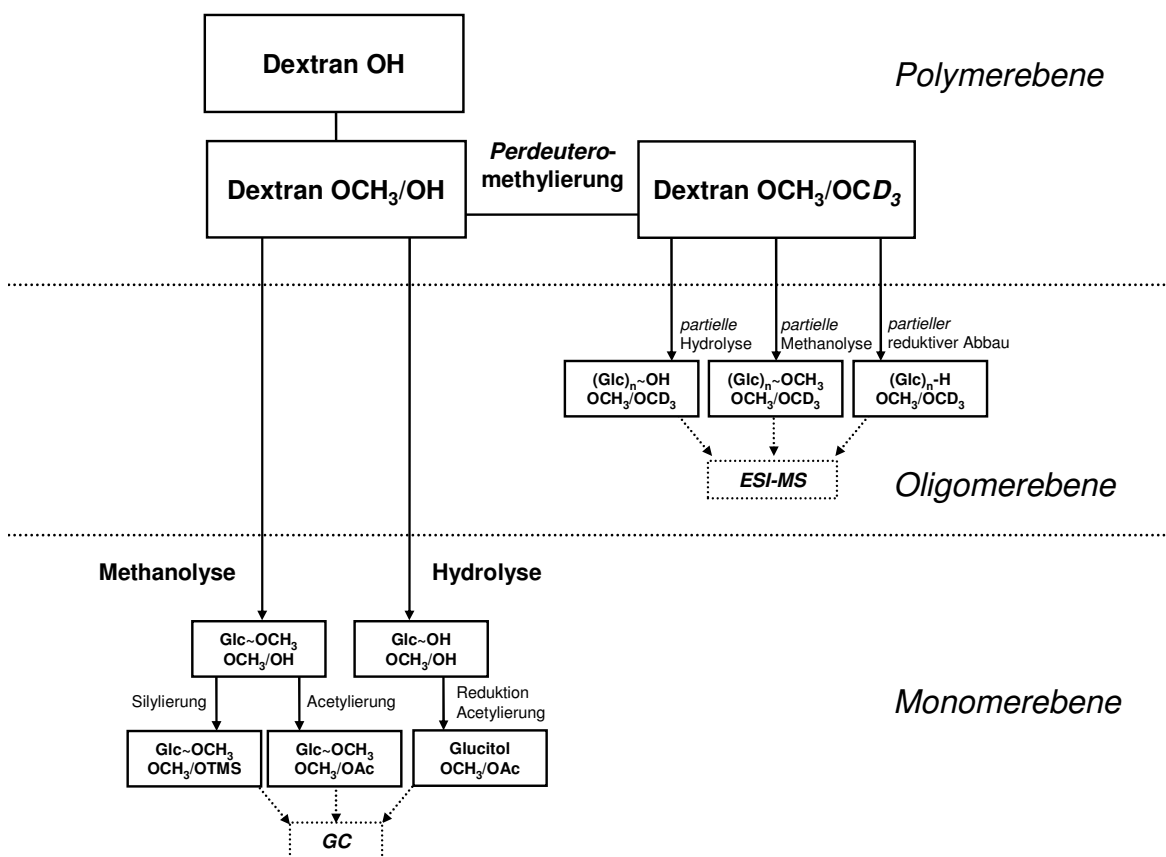


Abb. 7-1 Analyseschema zur Bestimmung des Methylmusters von Dextranen auf verschiedenen strukturellen Ebenen durch Gaschromatographie (GC) und Electrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)^[179].

Der Vergleich der experimentell erhaltenen Monomerdaten mit dem statistischen Modell (siehe 6.1.2.6) zeigte auch hier eine starke Heterogenität H_I (Abb. 7-2 und Abb. 7-3). Dieser Effekt war dabei erneut unabhängig von der Syntheseart: Sowohl für heterogen synthetisierte NaOH- als auch für mit Li-Dimsyl homogen synthetisierte Methyldextrane wurden mittlere bis starke Abweichungen vom statistischen Modell erhalten (H_I 7-26). Auch hier ist mehr Glucose noch unsubstituiert und mehr bereits trisubstituiert, als es eine mit gleicher Wahrscheinlichkeit für alle AGU ablaufende Reaktion erwarten lässt. Diese positive Abweichung von c_0 und c_3 wird durch eine negative Abweichung von c_1 und c_2 vom Modell kompensiert.

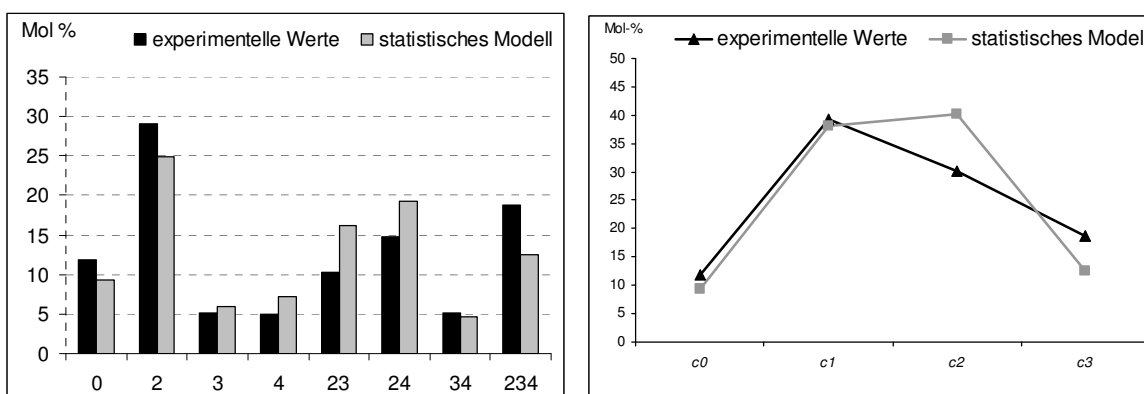


Abb. 7-2 Vergleich der experimentellen Werte des Monomermusters von **MeD 1** (1,7 Äq. NaOH, DS = 1,59) mit einem statistischen Modell, $H_I = 11,2$. Links: Monomermuster nach Positionen, rechts: c_0 bis c_3 (nach ^[179]).

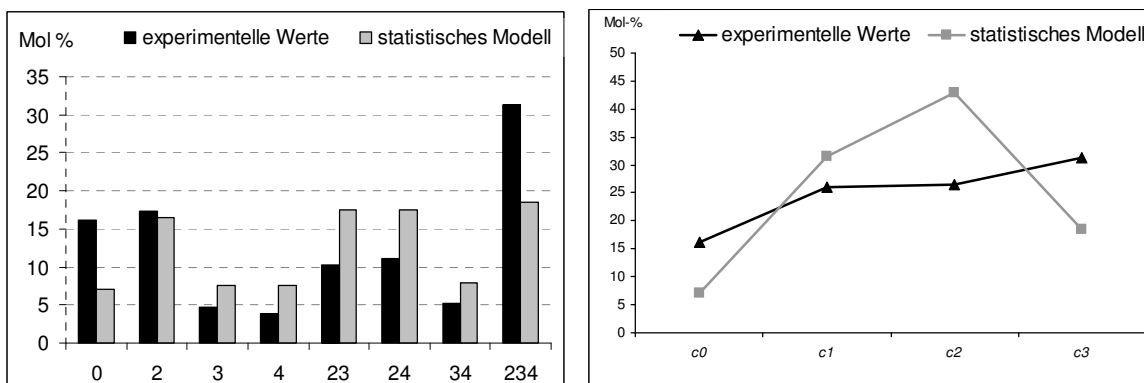


Abb. 7-3 Vergleich der experimentellen Werte des Monomermusters von **MeD 8** (0,9 Äq. Li-Dimsyl, DS = 1,76) mit einem statistischen Modell, $H_I = 19,2$. Links: Monomermuster nach Positionen, rechts: c_0 bis c_3 (nach ^[179]).

Nach vollständiger Substitution der verbliebenen OH-Gruppen der Methyldextrane durch CD_3I zwecks chemischer Vereinheitlichung, wurden nach partiellem Abbau mittels thermischer Hydrolyse, mikrowellenunterstützter Hydrolyse, Methanolyse oder durch einen partiellen reduktiven Abbau Oligosaccharidgemische erhalten, welche durch ESI-

Massenspektrometrie quantitativ analysiert wurden. Auf diese Weise konnten Informationen über die Methylverteilungen auf den Polymerebenen erhalten werden.

Erste Analysen der Oligomergemische (DP 2 und 3) zeigten einen hohen Anteil terminaler, d.h. am nicht reduzierenden Ende vier Substituenten tragende, Fragmente. Dieser Effekt kann zum Teil mit der leichteren Hydrolyse der α -1 \rightarrow 3 Verzweigungen erklärt werden^[179,227,228]. Da jedoch starke Säurekonzentrationen (2 M TFA bzw. 1,5 M/2,7 M methanolische HCl) verwendet wurden, sollte eine derartige Selektivität weitestgehend unterdrückt werden. Der Vergleich mit parallel durchgeführten dünnschichtchromatographischen Analysen der Abbauten (Beispiel siehe Abb. 7-5) zeigte, dass zum einen terminale Glucosen aufgrund der schnelleren Spaltung bei kurzen Abbauezeiten überwiegen, zum anderen jedoch im ESI-MS wegen ihrer höheren Anzahl von Methoxygruppen und der infolgedessen besseren Komplexierung mit Na-Ionen auch intensiver angezeigt werden. Hieraufhin wurden die Abbauten solange optimiert, bis auf der DC ein deutlicher Anteil an „internen“ Glucoseoligomeren sichtbar war. Dabei wurden verschiedene Varianten überprüft: Vorbehandlung mit Ultraschall, Temperaturerhöhung, Vorquellen in Aceton/Wasser, Mikrowellenbehandlung bei 300-600 W, Methanolyse und partieller reduktiver Abbau mit TMS-Triflat / Triethylsilan (siehe auch Abb. 7-1 und Tab. 7-2). Als Abbaumethode der Wahl zum Erhalt eines repräsentativen Oligomergemisches der perdeuteromethylierten Methylhexane, stellte sich die Hydrolyse mit 2 M TFA für 10 min bei 150 °C heraus. Die Analyse der Oligomergemische (DP 2 und 3) mittels ESI-MS ergaben hier nur noch einen um etwa 10 % höheren DS_{Methyl} als die Alditolacetat-GC-Methode. Die aus DP 3 berechneten Werte lagen dabei wenig höher als die aus DP 2 erhaltenen DS-Daten.

Bei TFA-Hydrolysen wurden mono-Trifluoracetate als Nebenprodukte detektiert, welche ein identisches Methylprofil ($\Delta m/z = 14$) wie die Hauptprodukte zeigten (siehe Abb. 7-4). Da keine Trifluoracetate von 6-O-methylierten Oligosacchariden der Kettenenden detektiert wurden, wurde hieraus geschlossen, dass die Veresterung mit TFA an der thermodynamisch hierfür am günstigsten primären 6-OH-Gruppe erfolgt ist. Die Veresterung erfolgt wahrscheinlich während der Entfernung der Trifluoressigsäure im Stickstoffstrom. Diese Derivate sind anders als die Hauptprodukte nicht von anderen Massenzahlen überlagert und waren daher interessant für eine quantitative Auswertung. Der aus diesen Derivaten bestimmte DS-Wert von MeD 4 ($DS_{GC} = 2,16$) lag zwischen 2,09 und 2,25 (DP 2) bzw. 2,15 und 2,23 (DP 3) (siehe Tab. 7-2).

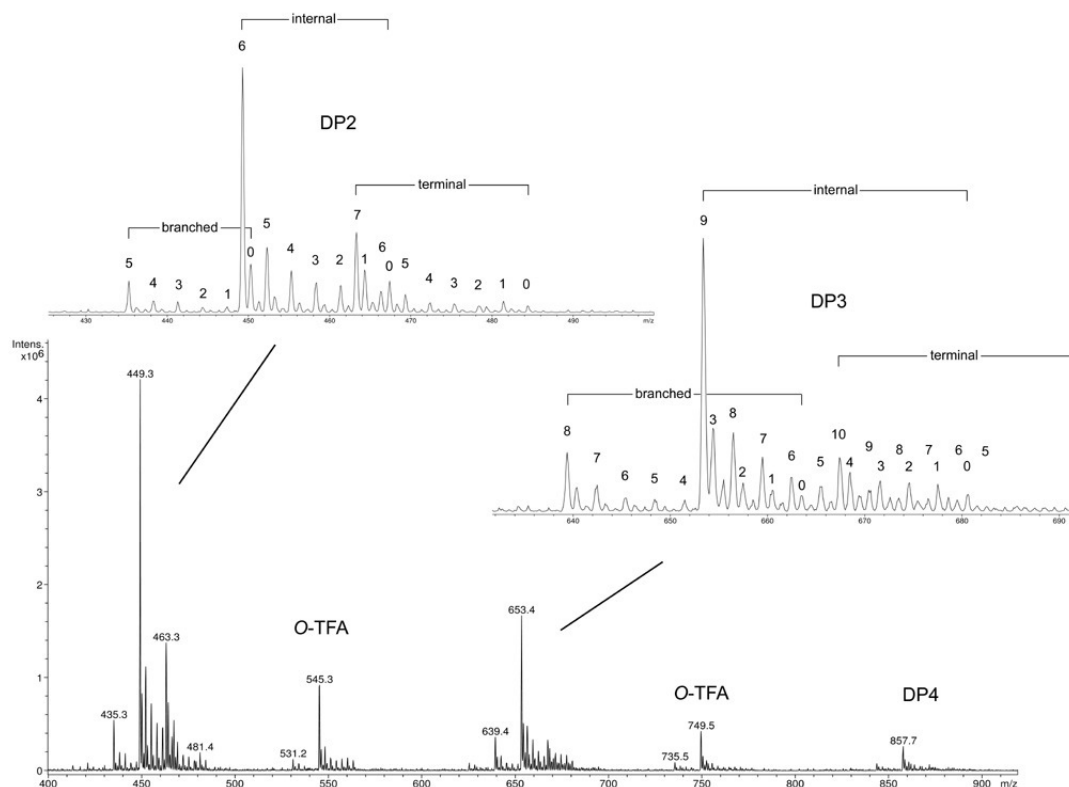


Abb. 7-4 ESI-MS des perdeuteromethylierten Methyl-dextrans **MeD 4** nach partieller Hydrolyse mit 2 M TFA, 150 °C, 10 min. Verschiedene Polymerisationsgrade (DP 2 – 4), verschiedene Teile des Moleküls (verzweigt/branched - intern/internal - terminal) sowie O-TFA-Nebenprodukte sind gezeigt. Die Zahlen bedeuten die Anzahl an Methylsubstituenten.^[179]

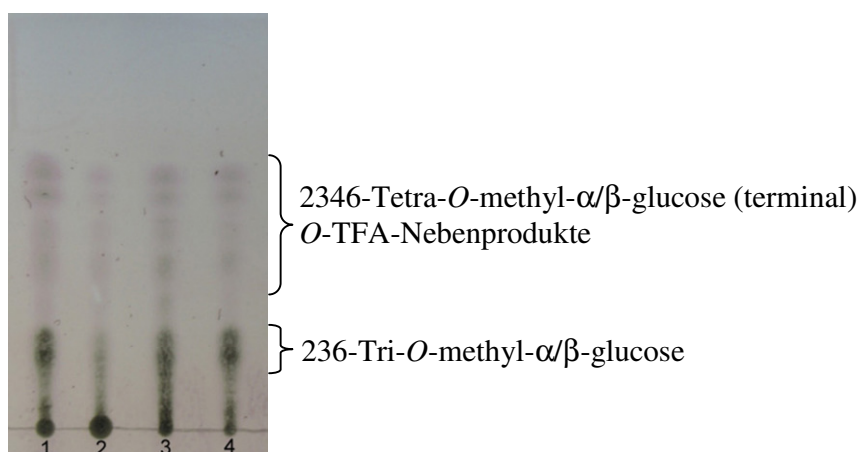


Abb. 7-5 Dünnschichtchromatogramm von perdeuteromethyliertem Methyl-dextran **MeD 4** (DS = 2,16). Kieselgel, Hexan/Aceton 6/4 (v/v), Detektion mit 10 % iger H_2SO_4 und Verkohlen. 1) 2 M TFA, 150 °C, 10 min, 2) 2 M TFA, 150 °C, 7 min, 3) Vorquellen in Aceton/Wasser, 2 M TFA, 150 °C, 10 min, 4) 2 M TFA, 3 x 25 sec 450 W Mikrowelle, Pausen 20 sec.

Tab. 7-2 Studien des partiellen Abbaus von **MeD 4**, DS = 2,16.

Methode (Reagenz)	Thermisch		Mikrowelle ^a		DS-Werte (ESI-MS)			
	T	Zeit	Leistung	Zeit	intern ^b		terminal	
	[°C]	[min]	[W]	[s]	DP 2	DP 3	DP 2	DP 3
Hydrolyse, 2 M TFA								
	120 ^c	6			2,15	2,34	2,68	2,58
					<i>1,64</i>	<i>1,79</i>		
	150	10			2,18	2,34	2,68	2,52
					<i>2,25</i>	<i>2,36</i>		
	150 ^d	10			2,19	2,25	2,64	2,44
					<i>2,09</i>	<i>2,26</i>		
			600	3 x 20	2,21		2,67	
			0	1 x 20				
			0	1 x 60				
			600	3 x 20	2,37	2,23	2,52	2,39
			0	2 x 20	<i>1,64</i>	<i>1,75</i>		
			450	3 x 20	2,18	2,32	2,62	2,49
			0	2 x 20	<i>1,80</i>	<i>1,95</i>		
			450	3 x 25	2,21	2,31	2,63	2,47
			0	2 x 20	<i>2,14</i>	<i>2,15</i>		
Methanolyse, MeOH / HCl								
1,5 M	90	12			2,04	2,07	2,58	2,40
1,5 M	90	20			1,99	2,14		
2,7 M	90	10			2,18	2,20		
Reduktiver Abbau ^e								
1,5 Äq. Lewissäure ^f , 5 Äq. TES	RT	5			2,25 ^g	2,29 ^g	2,43	2,66
					<i>2,16^h</i>	<i>2,12^h</i>		
1,5 Äq. Lewissäure ^f , 10 Äq. TES	RT	5			2,21 ^g	n.d.		
					<i>2,24^h</i>	<i>n.d.</i>		

n.d. = nicht detektiert

a = drei Perioden Bestrahlung unterbrochen durch Perioden ohne Strahlung

b = DS-Werte in *kursiv* wurden aus *O*-TFA-Produkten berechnet

c = Vorbehandlung für 2 min bei 150°C in Wasser

d = Vorbehandlung mit Aceton/Wasser (500µL/350µL), danach Zugabe von 150µL konz. TFA

e = Lösungsmittel CH₂Cl₂, Quenchen mit Pyridin, Waschen mit NaHCO₃

f = TMS Trifluormethansulfonat

g = 6-*O*-TMS-Produkteh = 6-*OH*-Produkte

Die Verteilung der Methylgruppen bei DP 2 und DP 3 zeigt die Fortsetzung des auf der Monomerebene beobachteten Trends auch auf der makromolekularen Ebene. Der Anteil unsubstituierter Fragmente ist, unabhängig vom DP, größer als für die statistische Verteilung aus den GC-Monomerdaten berechnet, was ausgedehnte unsubstituierte

Bereiche in der Glucankette bzw. niedrig substituierte Dextranmoleküle anzeigt. Die Methylierung erfolgt zudem begünstigt in bereits niedrig substituierten Bereichen und schneller als in unsubstituierten, wenig zugänglichen Bereichen. Der relative molare Anteil nimmt mit der Anzahl Methylgruppen $n(\text{Me})$ bei MeD 9 (DS 2,06) nahezu linear zu (siehe Abb. 7-6). Dieses entspricht einem DS-Gradienten auf der makromolekularen Ebene, wobei ohne zusätzliche Fraktionierung wiederum nicht zwischen Heterogenität erster Ordnung (über die Dextranmoleküle) und zweiter Ordnung (über die Polymerketten) unterschieden werden kann (siehe auch Abschnitt 5.3).

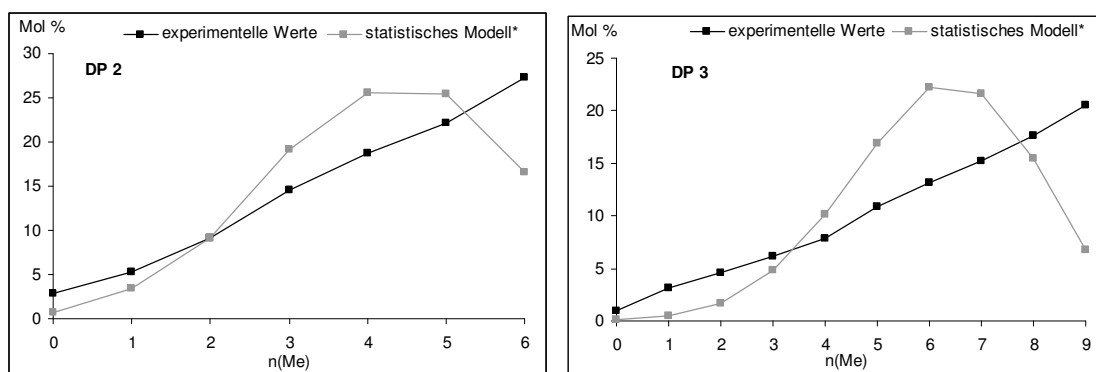


Abb. 7-6 Methylverteilung in Di- (DP 2, links) und Trisacchariden (DP 3, rechts) nach partiellem Abbau des perdeuteromethylierten Methyldextrans **MeD 9**, DS (GC)= 2,06, $H_2 = 14,3$ (DS 2,08), $H_3 = 19,4$ (DS 2,09). * = basierend auf nach GC-Analytik berechneten Monomermustern (nach ^[179]).

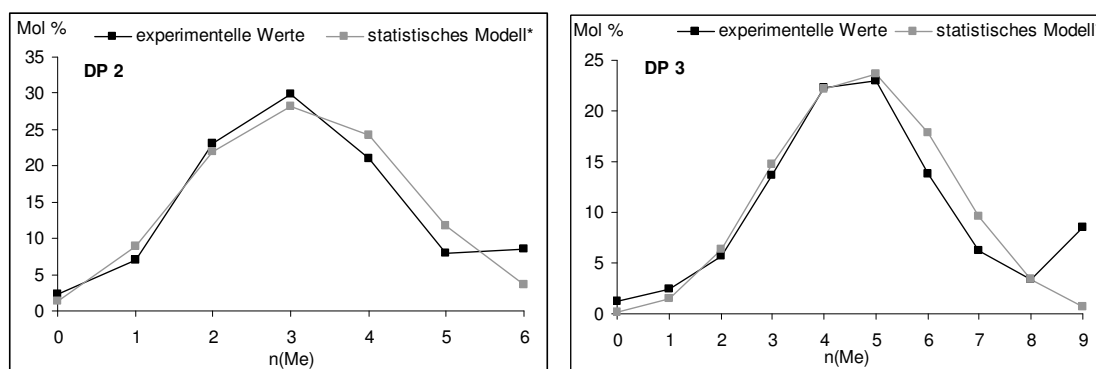


Abb. 7-7 Methylverteilung in Di- (DP 2, links) und Trisacchariden (DP 3, rechts) nach partiellem Abbau des perdeuteromethylierten Methyldextrans **MeD 1 (NaOH)**, DS (GC)= 1,59, $H_2 = 7,6$ (DS 1,59), $H_3 = 9,7$ (DS 1,63). * = basierend auf nach GC-Analytik berechneten Monomermustern (nach ^[179]).

Das mit NaOH synthetisierte Methyldextran MeD 1 (Abb. 7-7) zeigt dagegen eine völlig andere Abweichung vom statistischen Modell als die mit Li-Dimsyl synthetisierten

Methylhextrane. Dieses Profil einer bimodalen Verteilung wurde bereits auch für andere mit NaOH hergestellte Methylpolysaccharide wie Amylose und Cellulose beobachtet.

Um zwischen einer Heterogenität erster und zweiter Ordnung unterscheiden zu können, wurden ausgewählte Methylhextrane mit Wasser und Dichlormethan fraktioniert. Hierbei wurden gravimetrisch messbare Fraktionen erhalten. Die Monomermusteranalyse der Extrakte und der Rückstände sowie die Rekombination der Ergebnisse ergaben den Ausgangs-Methyl-DS. Es liegt demnach auch zu einem gewissen Maß eine DS-Verteilung über die verschiedenen Dextran-Makromoleküle vor (Heterogenität erster Ordnung).

Eine Ursache der ungewöhnlichen Heterogenität der Methylhextrane kann die verzweigte Struktur mit 1-2 % Langkettenverzweigung des Dextrans sein. Mit steigendem Molekulargewicht nehmen der Grad der Verzweigung und damit der „hyperbranched“-Charakter und die Dichte der Moleküle zu^[23]. Die Wandlung der Morphologie von einem Knäuel hin zu einer kompakten Kugel geht einher mit einer zunehmenden Unzugänglichkeit des Materials. In Zusammenspiel mit den Mechanismen der Alkylierungsreaktionen, welche die Ausbildung eines Polyanions durch Li-Dimsyl im ersten Schritt beinhaltet, kann dieser zu einer Abschirmung innen liegender Bereiche führen. Bei geringen Li-Dimsyl-Konzentrationen erfolgt die Deprotonierung der OH-Gruppen langsam und lässt eine Diffusion des Li-Dimsyls in das Makromolekül zu. Mit zunehmender Menge an Base geschieht die Deprotonierung schneller, als die Base in das Makromolekül diffundieren kann. Die Diffusion in das Innere des Makromoleküls wird durch elektrostatische Abstossung verhindert, so dass sich ein negativ geladener „Schutzschild“ bildet. Bei geringen Basenkonzentrationen bleibt in der Folge das Innere des Makromoleküls oder daraus gebildeter Aggregate unsubstituiert, während der Grad der Methylsubstitution (DS) von außen nach innen abnimmt. Das Modell der Abschirmung ist jedoch nicht nur auf einzelne Makromoleküle beschränkt, sondern kann ebenso auf Cluster mehrerer Dextranmoleküle angewandt werden. Auf diese Weise würde die Heterogenität erster Ordnung (über verschiedene Moleküle) begünstigt.

Dieses Modell sollte in weiteren Versuchen mit systematischer Variation einzelner Bedingungen noch eingehender untersucht werden.

7.3 Enzymatischer Abbau von Methylhextranen

Ausgewählte Proben der mit Li-Dimsyl synthetisierten Methylhextrane (MeD 6-9, DS 0,76-2,07, M_w 70 kDa) wurden analog den Allylhextranen mit Dextranase aus *Chaetomium erraticum* inkubiert (siehe Abschnitt 6.1.2.7). Zum Vergleich wurde das native Dextran M_w 70 kDa (DS = 0) parallel bei denselben Bedingungen abgebaut. Hier konnten 71 % der Glucose freigesetzt werden (Abb. 7-8). Bei einem DS von 0,76 (MeD 6) konnten 21 % der unsubstituierten Glucose freigesetzt werden, bei höherem DS nur noch 6,8 bis 10,8 %. Bei derart heterogenen Proben (H_I 7-19) sollten normalerweise größere Bereiche an unsubstituierten Bereichen vorliegen, die somit enzymatisch gut zugänglich sind. Diese Beobachtung deckt sich demnach erneut mit der Charakteristik, die auch bei den Allylhextranen für den enzymatischen Abbau beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 6.1.2.7) und stützt den Befund einer alternativen, Dimsyl-verursachten Heterogenität (Abschirmung der inneren Bereiche). Die unsubstituierten Bereiche sind offensichtlich weder bei Folgesubstitutionen noch bei enzymatischen Abbauten zugänglich.

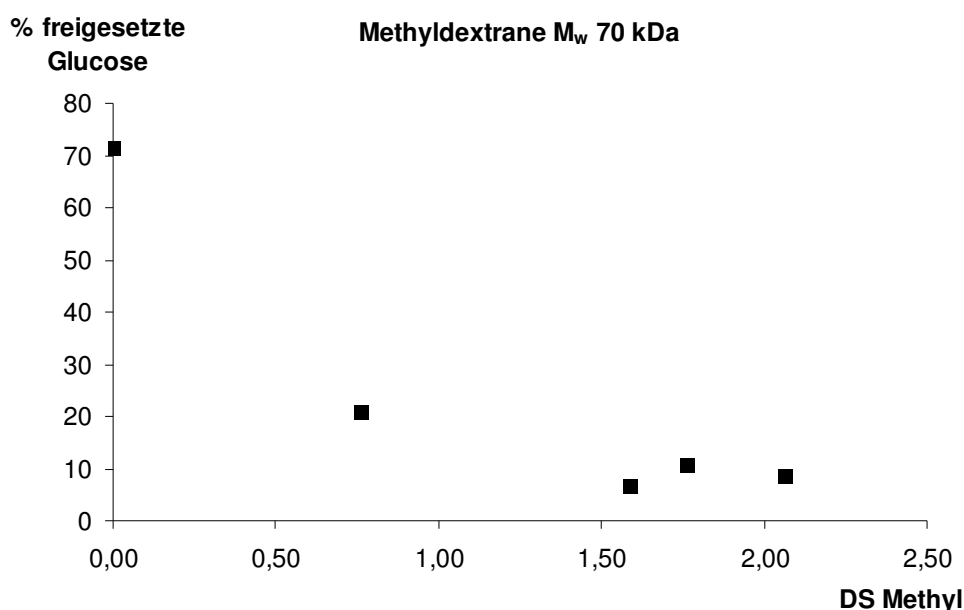


Abb. 7-8 Enzymatisch freigesetzte Glucose (in %, bezogen auf unsubstituierte Glucose aus GC-Analytik) in Abhängigkeit des Methylsubstitutionsgrades von Methylhextranen (M_w 70 kDa).

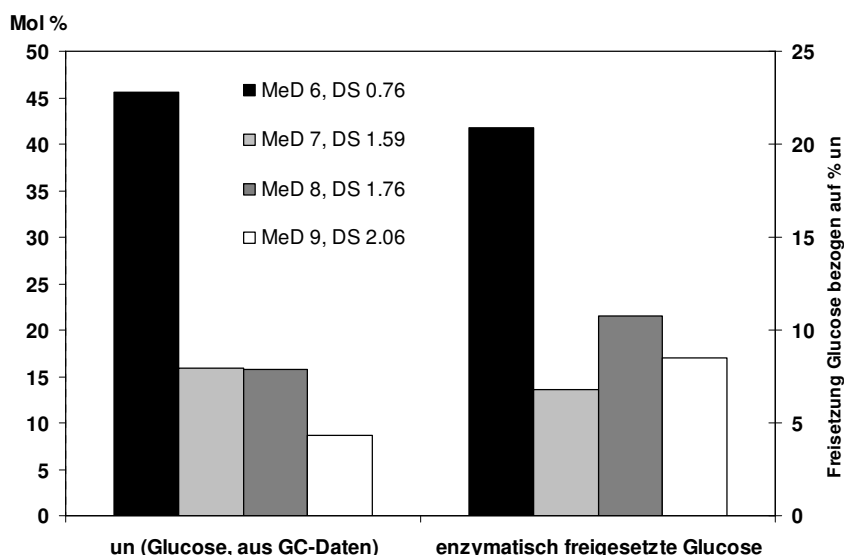


Abb. 7-9 Vergleich der in Methyldextranen enthaltenen Menge unsubstituierter Glucose (c_0 , Mol-% aus GC-Analytik, links) und Gegenüberstellung der hiervon enzymatisch freisetzbaren Glucose in % (rechts).

Im Vergleich zu den untersuchten Allyldextranen, bei welchen die enzymatische Abbaubarkeit bereits ab einem DS von 0,2 rapide sank (siehe 6.1.2.7) und ab einem DS von etwa 1,0 weniger als 5 % der enthaltenen unsubstituierten Glucose enzymatisch zugänglich war, konnte bei den Methyldextranen selbst bei einem DS von 2,06 mit 8,5 % noch eine signifikante Menge der enthaltenen unsubstituierten Glucose freigesetzt werden. Dieses ist vermutlich auf die bei Allyldextranen mögliche Vernetzung als weitere Behinderung des Abbaus zurückzuführen, die bei den Methyldextranen als Störfaktor unterbleibt.

8 Dextran-Eisenoxid-Nanopartikel

Ein Motiv für die Synthese funktionalisierter Dextrane ist deren potentielle Anwendung zur Beschichtung ferromagnetischer Nanopartikel (siehe Kapitel 1.6), um deren Agglomeration zu verhindern. Neben der Stabilisierung kann über diese Schichten eine Funktionalisierung der Nanopartikel erfolgen, um Signalmoleküle wie z.B. Enzyme oder Antikörper anzubinden. Die Abtrennung von Molekülen aufgrund der magnetischen Eigenschaften der Partikel sowie die Veränderung der Magnetisierbarkeit durch Belegung der Oberfläche mit Analyten sind hierbei mögliche Anwendungen. In der vorliegenden Arbeit wurden Vorversuche zur Synthese von mit Dextran beschichteten magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln durchgeführt.

Zur Synthese von magnetischen Nanopartikeln stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: Copräzipitation, Thermische Zersetzung, Mikroemulsion und Hydrothermalsynthese (siehe Kapitel 1.6). Zur Beschichtung von Eisenoxidnanopartikeln mit Dextranen finden sich in der Literatur vor allem Vorschriften zur Mitfällung, welche apparativ relativ einfach sind und mit hoher Ausbeute verlaufen, jedoch in der Größenverteilung und der Formkontrolle der Partikel gegenüber den anderen Methoden gewisse Nachteile aufweisen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Synthese von Dextran-Eisenoxid-Nanopartikeln angelehnt an diese literaturbekannten Methoden der Copräzipitation^[234-237]. Hierbei wurde zu einem entgasten Gemisch aus einer Eisen(II)/Eisen(III)-Salzlösung eine wässrige Dextran-Lösung gegeben und durch die Zugabe von Ammoniumhydroxid (28 %) im alkalischen Milieu unter N₂-Atmosphäre eine Mitfällung ausgelöst. Als Eisensalze dienten hierbei FeCl₂ · 4 H₂O und FeCl₃ · 6 H₂O. Bei der Synthese der Partikel wurden verschiedene Parameter variiert, welche im Folgenden diskutiert werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 8-1 zusammengefasst.

Mit ausgewählten Produkten wurden nach hydrolytischem Aufschluss Eisen- (ICP-OES, AAS) und Glucosegehaltsbestimmungen (enzymatisch) durchgeführt. Die Größenverteilung der erhaltenen Nanopartikel wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Schilling und Dr. Ludwig (Institut für elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik, TU Braunschweig) mittels **Magnetrelaxation (MRX)**^[64] bestimmt. Bei dieser Methode werden die Proben mit Mannit versetzt und durch Gefriertrocknung in der Zuckermatrix immobilisiert. Die superparamagnetischen Proben werden in ein äußeres Magnetfeld gebracht, wodurch sie ein magnetisches Moment ausbilden. Nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes wird die Zeit zur Relaxation („Entmagnetisierung“) gemessen. Durch die Einbettung in die Mannit-Matrix kann das magnetische Signal nach der Magnetisierung nur durch das Drehen des Magnetisierungsvektors innerhalb des Kerns relaxieren (sogenannte Néel-Relaxation) und wird nicht durch Drehung des gesamten Nanopartikels (sogenannte Brown-Relaxation) gelöscht. Die Auftragung des normierten magnetischen Signals über die Zeit ergibt Relaxationskurven, aus welchen die Verteilungsfunktion über den wahrscheinlichen Kerndurchmesser berechnet werden kann. Wenn keine Relaxation messbar ist, sind die Partikel entweder zu klein, als dass sie mit dem vorhandenen Messaufbau nachweisbar wären, oder es handelt sich um nicht superparamagnetische Cluster. Diese Agglomerate zeigen auch nach Ausschalten des

äußeren Magnetfeldes ein magnetisches Moment (Remanenz) und sind daher mit der MRX nicht messbar.

Um magnetische Eisenoxidnanopartikel aus Magnetit (Fe_3O_4) zu erhalten, ist ein stöchiometrisches **Verhältnis von Fe^{3+} zu Fe^{2+}** von 1 - 2 notwendig^[238], so dass eine Variation nur innerhalb dieses Bereiches vorgenommen wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei einem abnehmendem Verhältnis von Fe^{3+} zu Fe^{2+} innerhalb dieses Bereiches dunklere und größere Partikeln erhalten werden^[234]. In der vorliegenden Arbeit zeigten einzig Partikel, welche mit einem Verhältnis von 1,5 : 1 (mol/mol) hergestellt wurden, Remanenz bei MRX-Messungen (Tab. 8-1, Nr. 16, 18, 20, 21).

Einigen Ansätzen wurde anstelle des Fe^{2+} -Salzes oder zusätzlich **Ascorbat** hinzugesetzt. Dieses sollte einen entsprechenden stöchiometrischen Anteil der Fe^{3+} Ionen zu Fe^{2+} reduzieren, so dass das notwendige Verhältnis der Eisenionen entsteht bzw. einer möglichen Oxidation des Fe^{2+} entgegenwirken. In hydrothermalen Ansätzen der Nanopartikelsynthese konnte zudem gezeigt werden, das Ascorbat neben seiner Funktion als Reduktionsmittel die Struktur der erhaltenen superparamagnetischen Partikel stabilisiert^[239]. Jedoch wurden bei der Copräzipitation von Dextran mit Eisensalzen in der vorliegenden Arbeit bei zahlreichen Versuchen auf diese Weise nur braune bis schwarze, nicht magnetische Lösungen erhalten (Beispiel Tab. 8-1, Nr. 19).

Studien zur Synthese von magnetischen Nanopartikeln mit Dextransulfat durch Copräzipitation zeigten, dass einzig ein Verhältnis von Dextran : Fe^{3+} von 1:27 (mol/mol) erfolgreich war. Ein höherer **Polysaccharidanteil** führte zu einer kleineren Kerngröße und verringerter magnetischer Relaxation, geringere Polysaccharidgehalte zeigten hingegen gar keine Partikelbildung. Die Bezugsgröße der Polysaccharidangabe (mol AGU oder mol Dextran) ist hier jedoch nicht eindeutig^[234]. In der vorliegenden Arbeit wurde das molare Verhältnis der Gesamteisenionen zu Dextran (AGU) im Bereich von 0,2 bis 3,9 (mol/mol) variiert. Nanopartikel, die eine Remanenz zeigten, wiesen alle ein Edukt-Verhältnis von Fe/AGU von etwa 1,7:1 (mol/mol) auf (Tab. 8-1, Nr. 17, 18, 20, 21). Die **analysierten Glucose- und Eisengehalte** der Partikelsuspensionen lassen hingegen keinen Trend erkennen. Auch stehen die erhaltenen Werte in keinem Zusammenhang zu den bei der Synthese eingesetzten Konzentrationen an Eisen und Dextran, was die Schwierigkeiten der Reproduzierbarkeit bei der Nanopartikelsynthese verdeutlicht.

Tab. 8-1 Übersicht über Synthesen von Eisenoxid-Dextran-Nanopartikeln.

Ansatz							Analytik						
Nr.	Dextran [kDa]	Dextran [mmol AGU]	Fe(III)/Fe(II) [mol/mol]	Summe Fe [mmol]	Fe/AGU [mol/mol]	Auf- arbeitung	Glucose ¹⁾ [mmol/L]	Fe ²⁾ [mmol/L]	Fe ²⁾ [mg/kg NP]	Fe ²⁾ /Glc ¹⁾ [mol/mol]	Farbe	visuell magnetisch	MRX [nm]
1	15-25	8,59	1,5	14,99	1,74	e) c)	85,0	275,7		3,24			k. R.
2	40	8,74	1,5	14,99	1,71	e)	32,5	322,3		9,91			k. R.
3	15-25	3,81	1,5	14,99	3,93	e)	100,3	284,7		2,84			
4	40	19,22	1,5	14,99	0,78	e)	23,6	333,0		14,13			
5	15-25	8,78	1,0	11,99	1,37	e)	112,4	381,4		3,39			k. R.
6	40	19,27	1,0	11,99	0,62	e)	29,2	592,7		20,29			
7	15-25	8,61	2,0	17,99	2,09	e)	8,6	573,0		66,68			k. R.
8	40	19,39	2,0	17,99	0,93	e)	254,2	508,5		2,00			
9	red 15-25	8,34	1,5	14,99	1,80	e)	125,1	322,3		2,58			k. R.
10	red 40	8,59	1,5	14,99	1,75	e)	144,3	257,8		1,79			k. R.
11	40	15,47	1,5	7,54	0,49	e)	169,5	263,2		1,55			
12	15-25	15,47	1,5	14,99	0,97	e)	106,3						
13	CED 40	2,61	1,2	0,55	0,21	e)	52,7						
14	APD 40	2,61	1,2	0,55	0,21	e)	35,0						
15	15-25	8,59	1,5	14,99	1,74	d)	130,4						
16	40	8,64	1,5	14,99	1,73	a) H ₂ O	1,1						k. R.
17	500	8,64	1,5	14,99	1,73	b)	14,7						3,2
18	40	8,65	1,5	15,37	1,78	a) H ₂ O			234		schwarz	+	7,32
19	40	8,66	Ascorbat	15,03	1,74	a) H ₂ O			2495		schwarz	-	k. R.
20	40	8,68	1,5	15,16	1,75	a) NH ₄ OH			552		schwarz	+	6,86
21	40	8,65	1,5	15,00	1,73	a) NH ₄ OH			510		schwarz	+	6,50

¹⁾ enzymatisch bestimmt

²⁾ mittels ICP-OES bestimmt

k. R. keine Relaxation messbar

red mit NaBH₄ reduziertes Dextran

CED Cyanoethyl-dextran / Dextran Gemisch

APD Aminopropyl-dextran / Dextran Gemisch

a) Dialyse MWCO 12-14 kDa

b) Waschen und Dekantieren

c) Immobilisierung an magnetischer Säule

d) Gelfiltration Sephadex G-200

e) Zentrifugation

Die **Reaktionstemperatur und –zeit** haben nach Literaturangaben eher wenig Einfluss auf die Synthese der Nanopartikel^[234]. Daher wurden diese Parameter in dem für die Bildung von magnetischen Fe₃O₄-Partikeln notwendigen Bereichen (Temperatur 80 °C, Zeit: mind. 120 min) nur wenig variiert: Temperatur 70-90 °C, Zeit: 2-72 h. Der **pH-Wert** zur Bildung von Magnetit muss im Bereich von 8-14 liegen, jedoch ist die Menge der Base für die Nanopartikelsynthese entscheidend: nur in einem Bereich von 10-16 NH₄OH/Fe³⁺ wurden beschichtete Partikel erhalten^[234]. Bei geringeren Basenmengen bildeten sich keine Eisenkerne, bei zu großen Basenmengen wurden sehr große Kerne und Aggregate erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde 28 % iges NH₄OH verwendet, jedoch zumeist mit einem Überschuss von nur 4 : 1 (NH₄OH/Fe³⁺, mol/mol). Hier könnte eine Erhöhung der Basenmenge zukünftig eine Verbesserung der Synthese bringen. Eine Variation der Zutropfgeschwindigkeit der Base zwischen 1-60 min hatte keinen merklichen Effekt auf die Bildung der Partikel.

Zur Beschichtung der Eisenoxidpartikel wurden **Dextrane verschiedener Molekulargewichte** eingesetzt (6, 15-25, 40, 500 kDa). Kawaguchi *et al.*^[240,241] untersuchten die Bildung von Dextran-Magnetit-Komplexen in Abhängigkeit des Dextranmolekulargewichtes. Die Anbindung an das Eisen erfolgt dieser Literatur zufolge über die Carboxylgruppe am ehemals reduzierenden Ende des Dextrans, welche durch die Oxidation unter alkalischen Bedingungen erzeugt wurde. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Dextranmoleküle, welche an den Kern binden, proportional der Größe der Kernoberfläche ist. Je länger die Dextranketten sind, desto mehr bilden sich Verschlaufungen außerhalb des Magnetitkerns, und desto größer wird das Gesamtvolumen der Partikel (siehe Abb. 8-1). Um den Einfluss des Dextran-Molekulargewichtes bewerten zu können, müssten mehr Datensätze zur Verfügung stehen. In den durchgeführten Synthesen erwies sich M_w 40 kDa in mehreren Fällen als gut geeignet (Tab. 8-1, Nr. 16, 18, 20, 21).

Neben den nativen Dextranen wurden auch erste Versuche zur Synthese von Nanopartikeln aus Gemischen von Dextranen mit den **Dextranderivaten** Cyanoethyldextran (DS_{CE} = 1,25) und Aminopropyl-Cyanoethyldextran (DS_{AP} = 0,40, DS_{CE} = 0,92) durchgeführt. Diese verliefen jedoch noch erfolglos (Tab. 8-1, Nr. 13, 14).

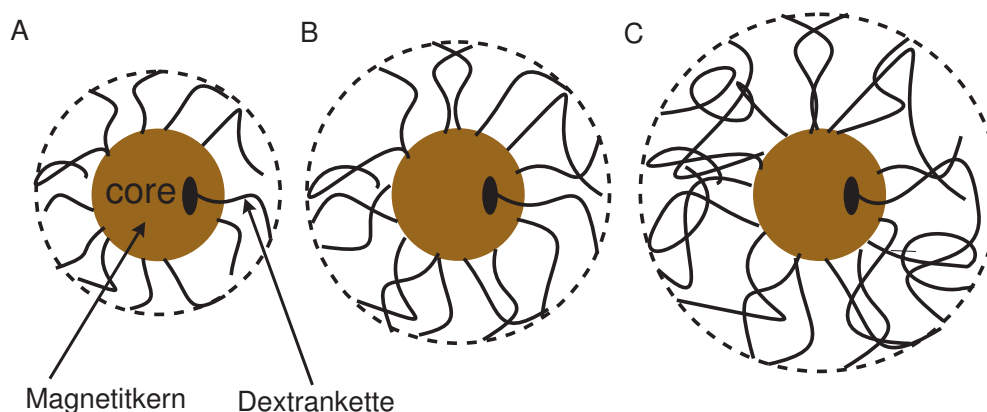


Abb. 8-1 Strukturmodelle von Dextran-Magnetit Nanopartikeln in Wasser. Das Molekulargewicht des Dextrans nimmt von A nach C zu (nach ^[241]).

Eine **Reduktion von Polysacchariden** mit Natriumborhydrid wird häufig empfohlen, um durch Deaktivierung der Aldehydgruppen am reduzierenden Ende stabilere beschichtete Nanopartikel zu erhalten^[242]. Jedoch wurden in der vorliegenden Arbeit mit reduziertem Dextran M_w 15-25 bzw. 40 kDa (Tab. 8-1, Nr. 9 und 10) keine magnetischen Nanopartikel erhalten.

Aufgrund der Agglomerationsgefahr der Partikel kommt der **Aufarbeitungstechnik** eine große Bedeutung zu. Um magnetische und mittels MRX messbare Partikel erwarten zu können, muss die Farbe der Lösungen tiefschwarz sein und die Partikel optisch durch einen Permanentmagneten magnetisierbar sein. Ansätze mit brauner Farbe oder fehlender Magnetisierbarkeit wurden daher teilweise ohne Aufarbeitung verworfen. Zentrifugation propagierte die Agglomeration der Partikel. Weder Überstand noch Rückstand zeigten messbare Relaxation, so dass diese Methode als eher ungeeignet angesehen wurde (Tab. 8-1, Nr. 1-14). Auch die Immobilisierung an einer magnetischen Säule (Nr. 1) sowie Gelfiltration an Sephadex G-200 (Nr. 15) führten nicht zu einer Isolierung der gewünschten magnetischen Nanopartikel. Bei der Aufarbeitung stellte sich die Dialyse gegen Wasser oder NH_4OH (alkalische pH-Kontrolle) als am geeignetsten heraus (Einträge 16, 18, 20, 21). Jedoch muss bedacht werden, dass nur überschüssige Eisensalze, jedoch nicht ungebundene Dextranmoleküle auf diese Weise entfernt werden.

MRX-Messungen der magnetischen Partikel zeigten, dass die Nanopartikel mit 3-7 nm noch sehr klein sind (Nr. 17, 18). Einträge 20 und 21 zeigten zwar noch Neel-Relaxation, agglomerierten aber bereits deutlich.

Den bislang erfolgreichsten Syntheseansatz magnetischer Dextran-Eisenoxid-Nanopartikel zeigt Tab. 8-1, Eintrag 18. Hier wurde unter Stickstoffatmosphäre Dextran 40 kDa (1,4 g/5 mL Wasser) mit $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1.5:1, mol/mol) gerührt und anschließend 5 mL NH_4OH (28 %) binnen 30 min unter Eiswasserkühlung hinzugegeben. Das Gemisch wurde anschließend für 6 h auf 85 °C unter Rühren erhitzt und das Produkt durch Dialyse (MWCO 12-14 kDa) gereinigt. Die erhaltenen Nanopartikel waren schwarz und magnetisch. MRX-Messungen ergaben einen mittleren Kerndurchmesser von 7,3 nm (siehe Abb. 8-3). Die Größenverteilung ist jedoch noch recht breit. Aufgrund relativ starker Neigung zur Aggregation waren Brownsche Relaxationsmessungen, welche eine Aussage über den Hüllendurchmesser ermöglichen sollten, nicht auswertbar.

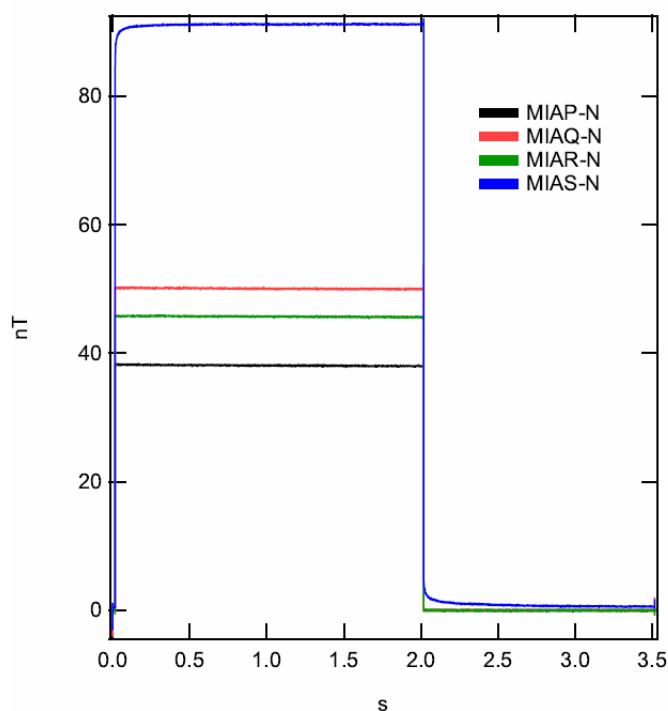


Abb. 8-2 Untersuchung der Magnetisierbarkeit: Remanenz [nT] = nano-Tesla, in Abhängigkeit der Zeit, NP (MIAS) (siehe Tab. 8-1, Nr. 18) ist magnetisierbar und zeigt keine permanente Remanenz.

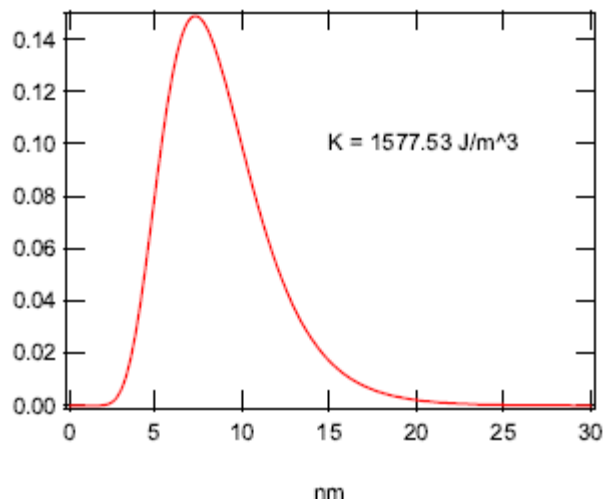


Abb. 8-3 Mittlere Größenverteilung (nm) berechnet aus der Relaxation nach Neel von Tab. 8-1, Nr. 18 (MIAS).

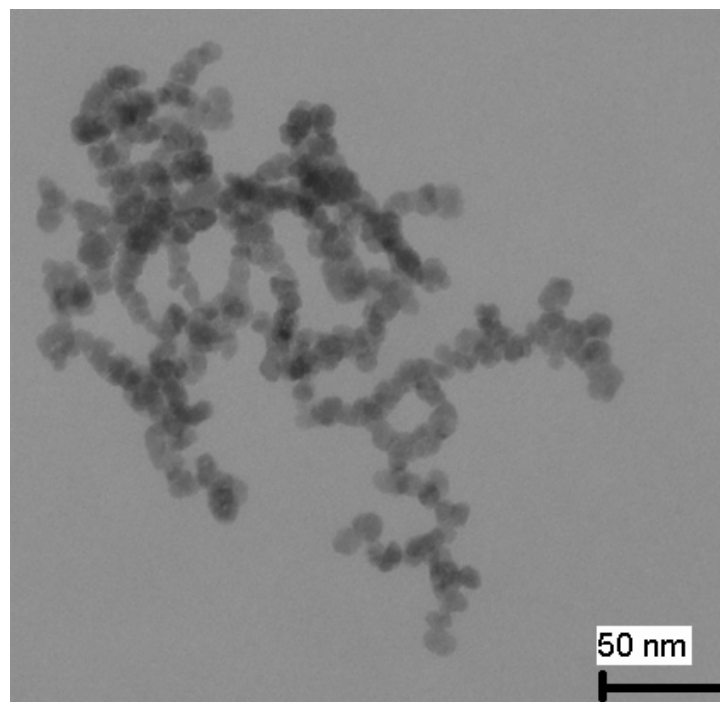


Abb. 8-4 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahme der Nanopartikel Eintrag 17, Tab. 8-1.

Transmissionselektronenmikroskopische (TEM)-Aufnahmen von Nanopartikeln (Eintrag 17, MRX: 3,2 nm) in Kooperation mit Dr. Lünsdorf, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, (Abb. 8-4) zeigten ebenfalls, dass die Kerne der Eisenoxid-Nanopartikel zum einen relativ klein sind ($< 10 \text{ nm}$), sowie zum anderen eine recht breite Größenverteilung aufweisen.

Zusammenfassend liegen die Herausforderungen der magnetischen Dextran(derivat)-Eisenoxid-Nanopartikel-Synthese derzeit in der Einstellung einer monodispersen Größe auf ca. 20 nm, der Verhinderung der Agglomeration und der Verbesserung der Reproduzierbarkeit mit verlässlicher Charakterisierung durch die Bestimmung des Eisen- und Glucosegehaltes. Möglicherweise kann die Verwendung wasserfreier Eisenchloride und eine rigide pH-Kontrolle während der gesamten Reaktion und Aufarbeitung die Reproduzierbarkeit und Kontrolle der Synthese verbessern.

Gerade für organolösliche Dextranderivate wäre die Synthese von beschichteten Eisen-Nanopartikeln über die thermische Zersetzung von Eisen-Acetylacetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) in organischen Lösungsmitteln^[243] eine bedenkenswerte Alternative.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Aminofunktionalisierte Polysaccharidhydrogele können für Oberflächenfunktionalisierungen bei verschiedenen medizinischen oder bioanalytischen Anwendungen eingesetzt werden. Über die funktionellen Gruppen lassen sich die Derivate sowohl kovalent anbinden als auch bioaktive Moleküle verankern. Bei der Synthese derartiger Derivate in einer polymeranalogen Reaktion können aminogruppenhaltige Reagenzien wegen ihrer im Vergleich zu den Kohlenhydrat-OH höheren Nucleophilie nicht ungeschützt mit dem Polysaccharid umgesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Strategie der Einführung von *O*-Alkenylethern als reaktive Intermediate und deren weitere Funktionalisierung zu Aminogruppen verfolgt. Auf diese Weise wird ein primäres Substitutionsmuster eines Spacers wählbarer Länge erhalten, dessen Doppelbindungen in einer Folgereaktion unabhängig und entkoppelt von den relativen Reaktivitäten der verschiedenen OH der Anhydroglucoseeinheit (AGU) vielfältig umgesetzt werden können.

Da bei der Modifizierung von Polysacchariden komplexe Produktgemische erhalten werden, wurden anhand der voll geschützten **Modells-substanzen** Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**) und Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**) verschiedene Funktionalisierungsmöglichkeiten von Alkenylethern untersucht. Die Epoxidierung mit Dimethyldioxiran bzw. (Trifluormethyl)methyldioxiran zu den zweifach epoxidierten Produkten verlief mit Ausbeuten von bis zu 65 %. Die anschließende nucleophile Ringöffnung mit verschiedenen *N*-Nucleophilen gelang vor allem mit Diethylamin (ca. 70 %) und Dibenzylamin (48 %) mit guten Ausbeuten. Die erhaltenen Benzylamin- und Dibenzylaminderivate ließen sich darüber hinaus in einer katalytischen Hydrierung zu den 3-Amino-2-hydroxypropylderivaten entschützen. Für die nucleophile Ringöffnung der Epoxide mit dem *S*-Nucleophil Cysteamin (Aminoethanthiol) wurde eine Ausbeute von ca. 50 % erzielt. Die in Kooperation mit Prof. Beller (Leibniz-Institut für Katalyse e.V. Rostock) durchgeführte Hydroaminomethylierung von **3** mit Morpholin zeigte mit einem Umsatz von ca. 70 % ebenfalls die potentielle Eignung für die Aminofunktionalisierung von Alkenylkohlenhydraten.

Der Schwerpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit lag auf der Synthese und Charakterisierung von *O*-Allyl- und *O*-Pentenyl-Dextranen. Bei der Reaktion von mit

Base (NaOH oder Li-Dimsyl) aktiviertem Dextran und Allylhalogeniden wurde der Einfluss verschiedener Reaktionsparameter wie Basenart, Äquivalente, Temperatur, Lichtausschluss und Antioxidantienzusatz untersucht. Zum Vergleich wurden zudem einige Alkenylderivate von Amylose und Stärke hergestellt. Die Charakterisierung der Produkte erfolgte mittels ATR-IR- und NMR-Spektroskopie sowie nach partieller oder vollständiger Depolymerisation mittels ESI-MS und Gaschromatographie. Es wurden Allyldextrane mit DS-Werten zwischen 0,08 und 2,51 erhalten. Die Regioselektivität der Allyl- und Pentenyl-Substitution von Dextran nahm in der Reihenfolge $2 > 4 > 3$ ab. Substitution der in terminalen Glucosylresten der verzweigten Dextrane zusätzlich enthaltenen 6-OH Gruppen wurde ebenfalls beobachtet.

Die erhaltenen Produkte zeigten eine große Abweichung von einer statistischen Verteilung der Substituenten. Während noch deutlich mehr un- und bereits signifikant mehr trisubstituierte Bausteine vorlagen, waren die mono- und di-substituierten Monomere unterrepräsentiert. Während diese Abweichung für die Grenzflächenreaktion mit fein dispergiertem festem NaOH bekannt ist, trat sie unerwartet auch bei den mit Li-Dimsyl unter homogenen Bedingungen synthetisierten Dextranderivaten auf. Zudem fiel die enzymatische Abbaubarkeit durch Dextranase (E.C. 3.2.1.11) trotz hoher Heterogenität der Derivate überdurchschnittlich stark mit steigendem DS ab. Aufgrund dieser Auffälligkeiten wurden analog **Methyldextrane** mittels NaOH bzw. Li-Dimsyl und MeI synthetisiert und analysiert, wobei auf eine für Methylpolysaccharide etablierte ESI-MS-Oligomer-Analysemethode nach Perdeuteromethylierung und partiellem Abbau zurückgegriffen werden konnte. Alle diese Produkte zeigten ebenfalls hohe und ähnliche Abweichungen von einer statistischen Verteilung der Substituenten und waren bei einem enzymatischen Abbau schlecht zugänglich. Die Oligomeranalytik zeigte eine starke Heterogenität der Derivate auch auf Polymerebene, die mit der Menge an Basenäquivalenten stark zunahm. Sie zeigen einen DS-Gradienten im Material, wobei die Oligomeranalytik nicht zwischen Heterogenität in und über die Polymermoleküle unterscheiden kann. Fraktionierungen durch Lösungsmittelextraktion zeigten, dass beide Arten der Heterogenität vorliegen.

Eine erste Deutung dieses Phänomens basiert darauf, dass hohe Basenmengen zu einer Deprotonierung an der Oberfläche des verzweigten Dextrans führen und in der Folge das gebildete Polyanion wie ein Schutzschild das Eindringen weiterer Dimsylanionen in den inneren Bereich verhindert. Alkenylamylosen zeigten eine deutlich geringere

Heterogenität. Daher wird vermutet, dass die dichte Struktur des Dextrans (hyperbranched), welche die mögliche Aufweitung infolge elektrostatischer Abstoßung begrenzt, diesen Effekt noch verstärkt. Die innenliegenden Bereiche sind im Anschluss weder für Substitutionsreaktionen noch für den enzymatischen Abbau zugänglich, wohingegen an der Peripherie ein hoher DS-Wert erhalten wird.

In Anlehnung an die für Methyl-dextrane bewährte chemische Vereinheitlichung (CH_3/CD_3) zur quantitativen **ESI-MS-Oligomeranalytik** wurde versucht, Allyldextrane nach Peralkylierung mittels Brompropan- d_7 oder (Bromethyl)methylether und partiellem Abbau zu analysieren. Jedoch war hier zum einen die erreichte Alkylierung nicht vollständig, zum anderen wurde in den Massenspektren der Abbauten einzig der Monomer-Bereich (DP 1) sinnvoll abgebildet. Hier bedarf es weiterer Optimierung, um eine verlässliche Oligomeranalytik der Allyldextrane aus DP 2- und DP 3-Daten ableiten zu können.

Problematisch für die weitere **Funktionalisierung der Allyldextrane** war deren Unlöslichkeit in gängigen organischen Lösungsmitteln. Obgleich experimentell in der vorliegenden Arbeit nicht bewiesen, wird eine Vernetzung der Derivate über die Allylgruppen angenommen. Der Zusatz des Antioxidans Hydrochinon führte zu einer besseren Löslichkeit der Substanzen. Die Allylpolysaccharide sollten daher vor einer weiteren Funktionalisierung nicht zu lange und unter Schutzgas, bei tiefen Temperaturen und mit Antioxidantien-Zusatz gelagert werden. Die Epoxidierung von Allyldextranen mit Dioxiranen (DMD, TFD) und die anschließende nucleophile Ringöffnung mit Cysteamin führten bislang nur zu einem 4 %igen Umsatz der Allylgruppen. Die radikalische Thioladdition von Cysteamin an Allyldextrane verlief mit einem Umsatz der Allylgruppen von bis zu 12 % etwas effizienter. Die Funktionalisierung der Alkenyldextrane sollte zukünftig weiter verfolgt werden, um die Bedingungen für die polymeranalogen Reaktionen der Alkenylether weiter zu optimieren. Zudem sollten die an der Modellsubstanz vielversprechenden Reaktionen wie die Hydroaminomethylierung und die Epoxidierung / *N*-nucleophile Ringöffnung mit Dibenzylamin und anschließender Entschützung auf die Polymerebene übertragen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten für potentielle Anwendungen der funktionalisierten Dextranderivate erste Dextran-beschichtete, magnetische Eisenoxid-**Nanopartikel** in einer Größe von ca. 7 nm, jedoch mit relativ breiter Größenverteilung

erhalten werden. Die Herausforderungen liegen derzeit in der Einstellung auf eine möglichst enge Größenverteilung < 20 nm, der Verhinderung der Agglomeration und der Verbesserung der Reproduzierbarkeit. Möglicherweise kann die Verwendung wasserfreier Eisenchloride und eine rigide pH-Kontrolle während der gesamten Reaktion und Aufarbeitung die Reproduzierbarkeit und Kontrolle der Synthese verbessern. Gerade für organolösliche Dextranderivate ist die thermische Zersetzung von Eisen-Acetylacetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) in organischen Lösungsmitteln zukünftig eine bedenkenswerte Synthesealternative.

10 Summary and future prospects

Aminofunctionalized polysaccharide hydrogels are used for functionalization of surfaces with respect to different medical and bioanalytical applications. Based on the functional groups it is possible to bind these derivatives covalently as well as anchor bioactive molecules. During synthesis of these derivatives it is not possible to apply reagents containing unprotected amino groups due to their higher nucleophilicity compared to the carbohydrate hydroxyl groups. Hence, the strategy followed in the present thesis included insertion of *O*-alkenyl ethers as reactive intermediates and further functionalization into amino groups. A distinct first substitution pattern of a spacer with varying length was achieved. The introduced double bonds can be converted to manifold derivatives, independently from the relative reactivities of OHs within the anhydro glucose unit.

Due to the fact that modification of polysaccharides yields complex mixtures of products, selected reactions of alkenyl ethers were studied based on the **model substances** methyl 2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzylidene- α -D-glucopyranoside (**3**) and methyl 4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-(pent-1-ene)- α -D-glucopyranoside (**4**). Epoxidation with dimethyldioxirane (DMD) respectively (trifluoromethyl)methyldioxirane (TFD) yielded 61 % of twice epoxidized products. Subsequent nucleophilic ring opening reaction with different *N*-nucleophiles especially with diethylamine (70 %) and dibenzylamine (48 %) resulted in good yields. The obtained benzylamine and dibenzylamine derivatives allowed deprotection using catalytic hydrogenation to yield 3-amino-2-hydroxypropyl derivatives. The nucleophilic ring opening reaction of the epoxides with *S*-nucleophile cysteamine (2-aminoethanethiol) resulted in 50 % yield. In cooperation with Prof. Beller (Leibniz Institute for Catalysis, Rostock), hydroaminomethylation of **3** with morpholine was realized. The conversion was about 70 % proving the potential for aminofunctionalization of alkenyl carbohydrates.

The second part of the present thesis focused on synthesis and characterization of ***O*-allyl and *O*-pentenyl dextran derivatives**. During the reaction of base-activated (NaOH or Li dimsyl) dextran with allyl halogenides, the influence of different parameters like nature of base, equivalents, temperature, exclusion of light and addition of antioxidants was studied. Additionally, some alkenyl derivatives of amylose and starch were prepared for comparison. Characterization of the products included ATR-IR and NMR spectroscopy as

well as ESI-MS and GLC after partial or complete depolymerization. The obtained allyl dextrans showed a degree of substitution (DS) between 0,08 and 2,51. Regioselectivity of allyl and pentenyl substitution was in the order $2 > 4 > 3$. Additionally, substitution of 6-OH at terminal AGUs was observed due to the branched structure of dextran.

The obtained products revealed a huge deviation from a statistical distribution of substituents. While the amount of still unsubstituted as well as already trisubstituted units was higher than expected, the mono- and disubstituted monomers were underrepresented. Whereas this divergence is known for the alkylation reaction with fine dispersed NaOH it was unexpected for the homogeneous reaction with Li dimsyl. Additionally, the enzymatic degradability with dextranase (E.C. 3.2.1.11) decreased with increasing DS more than expected although the derivatives showed high heterogeneities. Due to these unattended observations **methyl dextrans** were prepared in an analogous manner using CH_3I and NaOH or Li dimsyl, respectively. An established ESI-MS method for methyl polysaccharides after perdeuteromethylation and partial degradation could be adapted to the special requirements of dextrans. All methyl dextrans showed high and similar deviations from a statistical substituent distribution and were poorly accessible for enzymatic degradation. Oligomer analysis revealed a strong heterogeneity of methyl distribution on polymeric level as well which increased with the amount of base equivalents. The derivatives show a DS gradient within the material, however this analysis can not distinguish between heterogeneity in and over the polymer molecules. Fractionation using liquid-liquid extraction showed that both kinds of heterogeneity are present.

A first interpretation of this phenomenon is based on the idea that high amounts of base cause deprotonation on the surface of branched dextrans. As a consequence, the generated polyanion acts as protective shield and inhibits penetration of further dimsyl anions into the inner parts of the molecules and agglomerates. Respectively, alkenyl amyloses showed a significant lower heterogeneity. Hence, it is assumed that the dense hyperbranched structure of dextran, which limits the expansion due to electrostatic repulsion, enforces this effect. Accordingly, the inner parts are neither accessible for substitution reactions nor enzymatic degradation, whereas a high DS is achieved in the outlying parts.

According to the quantitative **ESI-MS oligomer analysis** method applied to methyl dextrans, allyl dextrans were analyzed after peralkylation with 1-bromo propane-*d*₇ or 1-bromo ethyl methyl ether and partial depolymerization. However, alkylation was not complete and the ESI mass spectra only showed DP 1 signals with sufficient intensity. Further improvement is necessary to achieve reliable data for oligomeric analysis of alkenyl dextrans.

In regard to further **functionalization of allyl dextrans** their insolubility in common organic solvents was crucial. Though experimentally not proven in the present thesis, a crosslinking of allyl derivatives is assumed. The addition of the antioxidant hydroquinone led to a better solubility of the substances. Therefore prior to further functionalization allyl polysaccharides should be stored only for a short period of time, kept under protection gases, at low temperatures and with addition of antioxidants. Epoxidation of allyl dextrans with dimethyl dioxiranes (DMD, TFD) and subsequent nucleophilic ring opening reaction with cysteamine led to only 4 % conversion of allyl groups. The radical thiol addition of cysteamine to allyl dextrans with a conversion of up to 12 % was more efficient. Future functionalization of alkenyl dextrans should improve conditions for polymer analogous reactions. In addition, the promising reactions of the model substances like hydroaminomethylation and epoxidation/*N*-nucleophilic ring opening reaction with benzyl amines and subsequent deprotection should be adopted for the polymer level.

The present thesis deals with first attempts to use functionalized dextran derivatives as coating material for magnetic iron oxide **nanoparticles** as potential application. The particles were about 7 nm in size and had a broad size distribution. Remaining challenges are the adjustment of a narrow size distribution below 20 nm, prevention of agglomeration and improvement of reproducibility. The use of anhydrous iron chlorides and a careful observation of pH during the whole reaction and work up could enhance the synthesis of dextran iron nanoparticles. Especially for organo soluble dextran derivatives the thermal decomposition of iron acetyl acetonate (Fe(acac)₃) could be an appropriate alternative for future synthesis work.

11 Material und Methoden

11.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Acros Organics, Fluka, Merck und Sigma-Aldrich bezogen. Für die Säulenchromatographie wurden Lösungsmittel der Qualität Fassware eingesetzt, welche durch Destillation gereinigt wurden. Lösungsmittel für Synthesen besaßen HPLC-, p. A.- oder p. S.- Qualität.

Allylbromid (3-Brom-1-propen)	puriss, $\geq 99\%$, Fluka
Allylchlorid (3-Chlor-1-propen)	purum, 98 %, Fluka
Allyliodid (3-Iod-1-propen)	Fluka
Benzaldehyddimethylacetal	Fluka
(2-Bromethyl)methylether (BME)	Aldrich
5-Brom-1-penten	96 %, Alfa Aesar
1-Brompropan- d_7	98 % D, Isotec / Sigma Aldrich
Cysteamin (Aminoethanthiol)	Fluka
Iodmethan- d_3 (CD_3I)	Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland
Iodmethan (CH_3I)	99 %, Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogenmonopersulfat	zur Synthese, Gehalt $KHSO_5$ ca. 45 %, Merck
Methyl- α -D-glucopyranosid	$\geq 99\%$, Fluka
Methyl-Lithium	purum, Aldrich, 5 % in Diethylether
1,1,1-Trifluoraceton	97 %, Aldrich
Dextranase (E.C. 3.2.1.11)	aus <i>Chaetomium erraticum</i> , Sigma D0443, Optimum: pH 5-6, Temperatur 50-60 °C

Dextrane

Die Dextrane wurden vor der Verwendung mehrere Stunden im Hochvakuum bei 60 °C getrocknet. Es wurden folgende Dextrane eingesetzt:

Dextran from	Fa.	Bestell- nummer	M_r * [kDa]	M_w GPC [g/mol]	s [g/mol]	M_w/M_n
<i>leuconostoc ssp strain 10817</i>	Fluka	31388	6	10520	+/- 3400	1,28
<i>leuconostoc mesenteroides</i>	Fluka	31387	15-25	17640	+/- 1900	1,10
<i>leuconostoc ssp strain 10817</i>	Fluka	31389	40	52700	+/- 12900	1,37
<i>leuconostoc ssp.</i>	Fluka	31390	70	n.b.	n.b.	n.b.
<i>leuconostoc ssp strain 10817</i>	Fluka	31392	500	448400	+/- 13900	1,79

* Herstellerangabe

s = Standardabweichung

11.2 Geräte und Materialien

Dünnschichtchromatographie

- Stationäre Phase: a) DC-Alufolien 20 cm x 20 cm Kieselgel 60 F₂₅₄, Fa. Merck
 b) DC-Plastikfolien 5 cm x 10 cm, Polygram Sil G/UV₂₅₄,
 Fa. MachereyNagel & Co.
- Detektion: 1) universal: Tauchen in 10 %ige ethanolische Schwefelsäure
 und anschließende Verkohlung mittel Heißluftfön
 2) Amine: Dragendorff-Tauchreagenz (bas. Bi(NO₃)₃/HAc/KI)
 (orange Spots auf gelbem Grund)
 3) Amine: Ninhydrin- Sprühreagenz (2g /L Ethanol) und an
 schließende Erhitzung (gelbe oder violette Spots)
 4) UV Detektion 254 nm
 5) Epoxide: Methylrot/KI/2-Butanol- Sprühreagenz
 (gelbe Spots auf rosa Grund)
- mobile Phase: variabel

Säulenchromatographie

- Stationäre Phase: Kieselgel 60 (70-230 mesh), Fa. Merck

Dialyse

- Dialysiermembranen: MWCO 14 kDa, regenerierte Cellulose, Fa. Carl Roth
 MWCO 3.5 kDa, Spectra/Por[®], Spectrum Laboratories Inc.
 Die Dialyse erfolgte in der Regel gegen demin. Wasser.

Gefriertrocknung

- Gerät: Alpha 2+, Firma Christ, Pumpe Vacuum Duo 5, Ethanolbad
Kühltemperatur: -20°C

Gaschromatographie

GC 1:

- Gaschromatograph: HRGC 5160 Mega Series, Carlo Erba
Säule: Chrompack, CP SIL 8 CB, (5%-Phenyl-Methyl-Polysiloxan)
 25 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm FD
 Retention Gap 1.5 m, Methyl- deaktiviert

Injektor:	Cold On-Column
Injektionsvolumen:	1 µL
Trärgas:	Helium (80 kPa)
Detektor:	FID, 300°C
Brenngase:	Wasserstoff (45 kPa), Synthetische Luft (70 kPa)
Integrator:	Merck-Hitachi D-2000 Chromatointegrator, Hitachi Ltd.
Temperaturprogramme:	1a) 60 °C (1), 20 °C/min 130 °C, 4 °C/min 290 °C (20)

GC 2:

Gaschromatograph:	GC 6000 Vega Series 2, Carlo Erba
Säule:	Chrompack, CP SIL 8 CB (5%-Phenyl-Methyl-Polysiloxan) 25 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm FD Retention Gap 1.5 m, Methyl- deaktiviert
Injektor:	Cold On-Column
Injektionsvolumen:	1 µL
Trärgas:	Wasserstoff (80 kPa)
Detektor:	FID, 300°C
Brenngase:	Wasserstoff (45 kPa), Synthetische Luft (70 kPa)
Integrator:	Merck-Hitachi D-2000 Chromatointegrator, Hitachi Ltd.
Temperaturprogramme:	2a) 60 °C (1), 20 °C/min 130 °C, 4 °C/min 290 °C (20)

GC 3:

Gaschromatograph:	GC 2010, Shimadzu
Säule:	Zebtron ZB-5-HT Inferno, Phenomenex (5%-Phenyl-Methyl-Polysiloxan) 28 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm FD Retention Gap 1.5 m, Methyl- deaktiviert
Autosampler:	AOC X-20i
Injektor:	Split/Splitless, 250 °C, Split: 0
Injektionsvolumen:	1 µL
Trärgas:	Wasserstoff (40 cm/sec, linear velocity mode)
Detektor:	FID, 310°C
Brenngase:	Wasserstoff (40 kPa), Synthetische Luft (400 kPa)
Make up Gas:	Stickstoff (30 kPa)

Software: Shimadzu GC-Solution Chromatography Data System,
Version 2.3

Temperaturprogramme: 3 a) 60 °C (1), 20 °C/min 200 °C, 4 °C/min 250 °C,
20 °C/min 310 °C (10)
3 b) 60 °C (1), 20 °C/min 130 °C, 4 °C/min 290 °C (20)

Gaschromatographie- Massenspektrometrie (GC-MS)

Gerät 1: GC-EI-MS

Gerät: Hewlett Packard 5890A / Finnegan TSQ 700

Säule: Phenomenex, ZB-1, 30 m x 0.32 mm ID, $t_f = 0.25 \mu\text{m}$

Injektor: Split /Splittless, 250 °C

Injektionsvolumen: 1 μL

Trärgas: Helium (1.6 mL/min, constant flow mode)

Transfer Line: 250 °C

Ion Source: 150 °C

Ionisationsspannung: 70 eV

Gerät 2: GC-EI-MS

Gerät: Agilent 6890 / JOEL GCmate II

Säule: J&W HP-5, 30 m x 0.32 mm ID, $t_f = 0.25 \mu\text{m}$

Injektor: Split (10:1), 250 °C

Injektionsvolumen: 1 μL

Trärgas: Helium (1.5 mL/min, constant flow mode)

Transfer Line: 250 °C

Ion Source: 180 °C

Ionisationsspannung: 70 eV

Elektrosprayionization-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Gerät: Esquire-LC, Bruker Daltronik GmbH, Bremen

Software: Bruker DataAnalysis Esquire-LC, Bruker Daltronik GmbH

Flow Rate:	140-200 $\mu\text{L/h}$	Cap Exit:	120 V
Modus:	positiv	Cap Exit Offset:	90 V
Dry Gas:	6 L/min	Skim 1:	30 V

Dry Temperature:	325 °C	Skim 2:	10 V
Capillary:	-3500 V	Trap Drive:	50,4
End Plate Offset:	-500 V	Cut Off:	$m/z = 50$
Nebulizer Gas:	N ₂ , 10 psi	Samples:	c ~ 0.5 mg/mL Methanol

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Säule:	Eurosphere 100 Si, 4 mm I.D., Knauer
Pumpe:	System Gold 126 Solvent Module, Beckman Coulter
Eluent A:	Aceton 50 %
Eluent B:	Hexan 50 %
Fluss:	0,6 mL/min
Autosampler:	System Gold LC 508, Beckman Coulter
Tray Temperatur:	25 °C
Injektionsvolumen:	20-100 µL
Detektor:	Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) PL-ELS 2100, Polymer Laboratories
Gasfluss:	Stickstoff (1,6 L/min)
Verdampfung:	70 °C
Vernebelung:	50 °C

NMR-Spektroskopie

NMR Gerät 1:	300 MHz, AV 300, Bruker Daltronik GmbH
Messfrequenz:	300,1 MHz (¹ H), 100,6 (¹³ C)

NMR Gerät 2:	400 MHz, Advance-Spektrometer, Bruker Daltronik GmbH
Messfrequenz:	400,13 MHz (¹ H), 100,61 (¹³ C)

Als Lösungsmittel wurden CDCl₃ + TMS, CD₃OD, D₂O oder DMSO-*d*₆ verwendet.

Multiplizitäten sind wie folgt angegeben:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett

Infrarot-Spektroskopie (ATR-IR)

Gerät:	Bruker Tensor 27
Technik:	Diamant-ATR (Attenuated Total Reflectance)
Anzahl der Scans:	32

Die Bandenintensitäten werden wie folgt abgekürzt: ss = sehr stark, s = stark, m = mittel, w = weak (schwach), b = breit, sb = sehr breit

UV-Vis-Spektroskopie

Gerät:	UV-2101, PC UV-Vis Scanning Spectrometer, Shimadzu
Wellenlänge:	340 nm, gegen Luft
Spaltbreite:	1 nm
Küvetten:	Kunststoff, 1 cm

Elementaranalyse

Gerät:	EA 1112, Carlo Erba Instruments Flash, Italien
Column:	Teflon, l=80 cm, 6 mm x 4 mm, Material Porapak QS, 80-100 mesh
Ofentemperatur:	85 °C
Brenntemperatur:	1000 °C
Trärgas:	Helium, 30 mL/min

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Gerät:	Hitachi Field Emission Scanning Electrone Microscope S-4800
Probenvorbereitung:	feste Proben: auf kolloidalem Graphit (Isopropanol) adsorbiert, im Exsikkator mehrere Tage getrocknet

ICP-OES

Gerät:	radiales ICP-OES Vista MPX, Fa. Varian, Darmstadt
Zerstäuber:	Seaspray-Zerstäuber, Zyklon-Zerstäuberkammer, 240 kPa
Leistung:	1,20 kW
Plasmagas:	Ar, 15,0 L/min
Hilfsgas:	Ar, 1,50 L/min
Emissionslinien Eisen:	Fe-Ionemissionlinien (nm): 234,35/ 238,204/ 239,563/ 259,940/ 260,709/ 261,187/ 261,382/ 373,713
Kalibration:	Stammlösung Fe 10,000 mg/L (Specpure, Fa. Alfa Aesar), externe Kalibrierung mit 5-200 mg/L Fe
Probenvorbereitung:	Aufschluss mit HNO ₃ (konz) und HCl (konz.) 3/1 (v/v), 4 h 120°C

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Pumpe:	Merck HITACHI L6000A
Säule:	PL-aquagel-OH Guard, PL aquagel-OH Mixed
Säulenofen:	40 °C
Eluent:	Wasser (0,02 wt% Natriumazid), 0,5 ml/min
Probenkonzentration:	1 mg/mL Wasser (0,02 wt% Natriumazid)
Detektor:	DAWN DSP Lichtstreuendetektor, Fa. Wyatt (St. Barbara, USA) Differential Refraktometer des Typs RI-101, Fa. Shodex (Tokio, Japan)

Autoklav

Gerät:	Fa. Berghoff
Volumen:	ca. 500 cm ³
Synthesegas:	H ₂ (30 bar)
Katalysator:	10 % Pd/C

Die Hydrierung erfolgte in Reagenzgläsern mit Rührkern bei Raumtemperatur.

Heizblöcke

Gerätetypen:	Digitherm, Barkey GmbH & Co. KG, Deutschland Bioblock Scientific, Firma Pierce Die Heizblöcke besitzen jeweils Heiz- und Rührfunktion.
--------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Mikrowelle

Gerät:	MDS-2000 multimode, CEM Corp., Matthews, NC, USA
Leistung:	max. 600 W
Probengefäße:	1 mL Teflon-Vials, rotierende Probenhalterung

Magnetrelaxometriemessungen (MRX)

Die Magnetrelaxometriemessungen wurden am MRX-Forschungssystem des Instituts für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik der TU Braunschweig durchgeführt. Der Aufbau der Messapparatur besteht aus einem Helmholtz-Spulensystem zur Magnetisierung der Probe und einer differentiellen Fluxgate-Anordnung (siehe Abb. 11-1). Das Probengefäß wird zwischen den differentiell angeordneten Fluxgate-Sensoren platziert. Diese Sensoren sind mit ihrer empfindlichen Achse senkrecht zum homogenen Magnetisierungsfeld der Helmholtz-Spule angebracht. Dadurch können die Sensoren nur

das Streufeld der Proben detektieren. Durch die differentielle Anordnung der Sensoren können Hintergrundsignale kompensiert werden und das Streufeld der Probe doppelt aufgenommen werden.

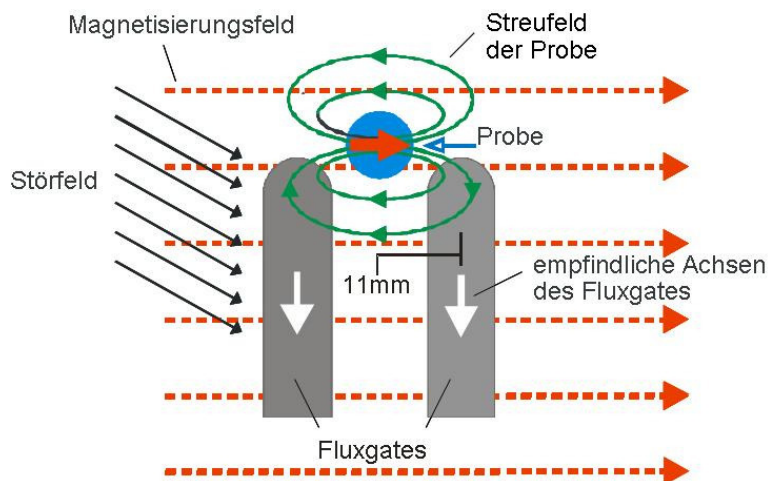
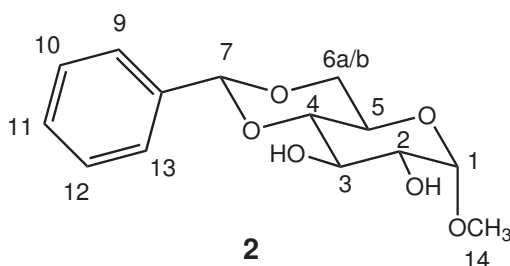


Abb. 11-1 Schematischer Messaufbau der Magnetrelaxometrie (MRX).

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Als Brown-Referenz wird die Nanopartikel-Probelösung verwendet. Für die Néel-Referenz werden die Nanopartikel in gesättigter D-Mannit-Lösung gelöst und gefriergetrocknet.

11.3 Synthesevorschriften

11.3.1 Methyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glucopyranosid (2)



5,35 g (28 mmol) Methyl- α -D-glucopyranosid (**1**) werden in 40 mL abs. DMF gelöst und mit 4,20 mL (28 mmol) Benzaldehyddimethylacetal sowie 100 mg (0,6 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Für 2,5 h wird bei 55 °C und 30 mbar das entstehende Methanol abdestilliert, anschließend die Lösung bei 80 °C und 20 mbar zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in CHCl₃ aufgenommen, das Produkt mit Petrolether gefällt und zur vollständigen Kristallisation bei -20 °C über Nacht gelagert. Das

abgetrennte Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus 2-Propanol/Pyridin (58/1, v/v) gereinigt und getrocknet. Man erhält 7,1 g (25 mmol = 89 % d.Th.) des weißen, feinkristallinen Feststoffs **2**.

R_f: Kieselgel, CHCl₃/MeOH 4/1, v/v = 0,73

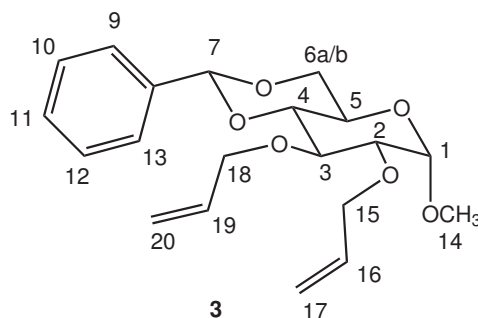
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ + TMS): δ (ppm) = 2,35 (s, br., 1 H, OH), 2,83 (s, br., 1 H, OH), 3,45 (s, 3 H, OCH₃), 3,46-3,94 (m, 5 H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a), 4,29 (dd, 1 H, H-6b, ³J_{6b,5} = 4,27 Hz, ²J_{6a,6b} = 9,83 Hz), 4,78 (d, 1 H, H-1, ³J_{1,2} = 3,93 Hz), 5,53 (s, 1 H, Ph-CH), 7,35-7,50 (m, 5 H, Ph)

¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃ + TMS): δ (ppm) = 137,0 (PhC-8), 129,2 (PhC-11), 128,3 (PhC-9,13), 126,3 (PhC-10,12), 102,0 (Ph-CH-7), 99,8 (C-1), 80,9 (C-4), 72,9 (C-2), 71,8 (C-3), 68,9 (C-6), 62,4 (C-5), 55,6 (OCH₃ C-14)

ATR-IR, ν (cm⁻¹) 3378 (m, v, O-H), 3060 (v, =C-H aromatisch), 2973, 2939, 2916, 2867 (w, v, C-H aliphatisch), 2843 (m, v, CH₃), 1452 (m, δ , CH₂ aliphatisch), 1160 (s, δ , O-H), 1068, 1025 (s, v, C-O-C), 749, 695 (s, δ , =C-H aromatisch, monosubst.)

MS (ESI, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 305 [M+Na]⁺

11.3.2 Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**3**)



Zu einer Mischung aus 3,0 g (10,6 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**2**) und 250 mL wässriger NaOH (33 %) werden 3,45 g (10,7 mmol) Tetrabutylammoniumbromid als Phasentransferkatalysator gegeben. Unter Rühren bei RT werden 2,7 mL (31 mmol = 1,5 Äq./OH) Allylbromid binnen 90 min hinzuge tropft. Das Gemisch wird 9 h bei 30 °C und weitere 12 h bei RT unter Rückfluss gerührt. Hiernach werden erneut 1,4 mL (=16 mmol) Allylbromid binnen 45 min hinzuge tropft und 7,5 h bei 30 °C sowie 12 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit etwa 2 g NaCl versetzt, mit Toluol extrahiert und die organische Phase mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄

getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch (Kieselgel, Hexan/Diethylether 1/1, v/v) gereinigt. Man erhält 3,25 g (=8,97 mmol, 85 % d. Th.) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) als weißen Feststoff.

R_f: Kieselgel, Hexan/Diethylether 1/1, v/v = 0,49

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃ + TMS): δ (ppm) = 3,36 (s, 3 H, OCH₃ 14), 3,39 (dd, 1 H, H-2, ³J_{2,1} = 3,72 Hz, ³J_{2,3} = 9,28 Hz), 3,47 (t, 1 H, H-4, ³J_{4,3} = 9,28 Hz), 3,65 (t, 1 H, H-6a, ³J_{6a,5} = 10,13 Hz), 3,74 (ddd, 1 H, H-5, ³J_{5,4} = 9,34 Hz, ³J_{5,6a} = 10,13 Hz, ³J_{5,6b} = 4,60 Hz), 3,80 (t, 1 H, H-3, ³J_{3,2} = 9,28 Hz), 4,09-4,14 (m, 1 H, H-6b), 4,19-4,29 (m, 4 H, H-15a/b, 18a/b), 4,70 (d, 1 H, H-1, ³J_{1,2} = 3,72 Hz), 5,05-5,25 (m, 4 H, H-17a/b, 20a/b), 5,47 (s, 1 H, H-7, Ph-CH), 5,80-5,93 (m, 2 H, H-16, 19), 7,25-7,44 (m, 5 H, Ph H 9-13).

¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃ + TMS): δ (ppm) = 137,4 (PhC-8), 135,2 (C-19), 134,8 (C-16), 128,8 (PhC-11), 128,2 (PhC-9,13), 126,0 (PhC-10,12), 117,7 (C-20), 116,7 (C-17), 101,3 (Ph-CH-7), 99,3 (C-1), 82,1 (C-4), 79,0 (C-2), 78,0 (C-3), 73,2 (C-18), 72,2 (C-15), 69,1 (C-6), 62,3 (C-5), 55,2 (OCH₃, C-14)

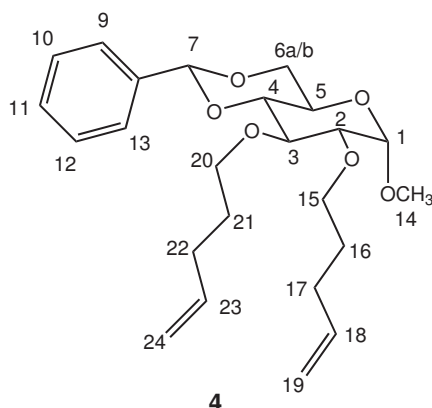
ATR-IR, ν (cm⁻¹) keine > 3200 (keine ν O-H), 3074 (w, ν , =C-H aromatisch), 2981, 2916, 2876 (w, ν , C-H aliphatisch), 2838 (m, ν , CH₃), 1650 (w, ν , C=C), 1451 (m, δ , CH₂ aliphatisch), 1374 (m, δ , CH₃), 1082, 1043 (s, ν , C-O-C), 753, 696 (s, δ , =C-H aromatisch, monosubst.)

MS (ESI, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 385,3 [M+Na]⁺, 401 [M+K]⁺, MS² 385: m/z = 343,2 [M+Na]⁺ -Propen

MS (GC-EI-MS): m/z (Rel-Intensität %) = 362 (0.1) [M⁺], 331 (0.1) [M⁺ - OCH₃], 321 (0.2) [M⁺ - H₂C=CH-CH₂], 306 (0.3) [M⁺ - H₂C=C=CH-OH], 213 (06) [M⁺ - 149], 149 (35) [C₆H₅-CH(-O-C⁶H₂)-(O-C⁴H⁺)], 127 (100) [CH₂=CH-CH₂-O⁺=CH-CH=CH-OCH₃], 105 (92) [C₆H₅-C^oO⁺], 91 (63) [C₆H₅-CH₂⁺], 77 (41) [C₆H₅⁺] [Daten gemessen am IfOK]

Röntgenstrukturanalyse: Daten siehe Literatur^[57].

11.3.3 Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**)



510 mg (1,81 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glucopyranosid (**2**) werden in 38 mL wässriger NaOH (33%) suspendiert. Nach Zugabe von 507 mg TBAB wird das Gemisch 10 min bei 32 °C gerührt. 630 μ L (5,32 mmol = 1,5 Äq./OH) 5-Br-1-penten werden binnen 40 min hinzuge tropft und 28 h bei 32 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit NaCl versetzt und mit Toluol extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockene eingeeengt. Eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Petrolether/Ethylacetat 9/1, v/v) liefert 621 mg (1,49 mmol = 82 % d. Th.) eines weißen amorphen Feststoffes von Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**).

R_f: Kieselgel, Petrolether/Ethylacetat 5/1, v/v = 0,66

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1,63-1,81 (m, 4 H, H-16a/b, 21a/b), 2,10-2,24 (m, 4 H, H-17a/b, 22a/b), 3,39 (dd, 1 H, H-2, ³*J*_{2,1} = 3,71 Hz, ³*J*_{2,3} = 9,29 Hz), 3,47 (s, 3 H, OCH₃ 14), 3,54 (t, 1 H, H-4, ³*J*_{4,3} = 9,19 Hz), 3,63-3,92 (m, 7 H, H-5, 6a/b, 15a/b, 20a/b), 4,31 (dd, 1 H, H-3, ³*J*_{3,4} = 9,41 Hz, ³*J*_{3,2} = 4,08), 4,83 (d, 1 H, H-1, ³*J*_{1,2} = 3,68 Hz), 4,90-5,13 (m, 4 H, H-19a/b, 24a/b), 5,57 (s, 1 H, H-7, Ph-CH), 5,74-5,94 (m, 2 H, H-18,23), 7,34-7,56 (m, 5 H, Ph H 9-13).

¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 138,4 (C-23), 138,1 (C-18), 137,4 (PhC-8), 128,8 (PhC-11), 128,2 (PhC-9,13), 126,0 (PhC-10,12), 114,8 (C-19), 114,5 (C-24), 101,2 (Ph-CH-7), 99,0 (C-1), 82,0 (C-4), 80,4 (C-2), 78,3 (C-3), 72,6 (C-20), 71,4 (C-15), 69,1 (C-6), 62,4 (C-5), 55,3 (OCH₃, C-14), 30,2 (C-22), 30,1 (C-17), 29,5 (C-21), 29,1 (C-16)

ATR-IR, ν (cm^{-1}) 3082, 3067 (w, ν , =C-H aromatisch), 2982, 2917, 2868 (w/m, ν , C-H aliphatisch), 1642 (m, ν , C=C), 1449 (m, δ , CH_2 aliphatisch), 1366 (m, δ , CH_3), 1085, 1057 (s, ν , C-O-C), 744, 693 (s, δ , =C-H aromatisch, monosubst.)

MS (ESI, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 441,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

EA: Theorie: C: 68,87 %, H: 8,19 %, gemessen: C: 69,24 %, H: 8,28 %

11.3.4 Allgemeine Vorschriften zur Epoxidierung

11.3.4.1 Epoxidierung mit Wasserstoffperoxid

150 mg (0,41 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) werden in 1,25 mL wässriger Lösung aus NaHCO_3 (10 g/L) und Na_2CO_3 (50 mg/L) suspendiert, mit 385 μL Acetonitril versetzt und 30 min auf 40 °C erwärmt. Binnen einer Stunde werden 180 μL 30 %iges H_2O_2 in mehreren Portionen bei RT hinzuge tropft und mehrere Stunden bis Tage gerührt. Die wässrige Lösung wird mit NaCl gesättigt, mit Toluol extrahiert, getrocknet und eingeengt.

11.3.4.2 Epoxidierung mit Metachlorperbenzoesäure

100 mg (0,28 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) werden in 3 mL trockenem Dichlormethan gelöst, mit 170 mg (0,88 mmol = 1,5 Äq./DB) trockener *m*-CPBA (p. S.) versetzt und bei 50 °C oder RT für mehrere Stunden bis Tage gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Wasser gewaschen und die organische Phase eingeengt.

11.3.4.3 Epoxidierung mit Dimethyldioxiran (DMD) nach Adam^[155]

100 mg (0,28 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) werden in 6,5 mL Acetonitril/ Dimethoxymethan (2/1, v/v) gelöst, mit 1,8 mL 0,1 M $\text{K}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ und 1,2 mL (16,3 mmol) Aceton versetzt. 8,3 mg (24 μmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat wird als Phasentransferkatalysator hinzugegeben. Durch ein Septum werden simultan binnen 2 h 1,8 mL von KHSO_5 in 0,4 mM wässriger EDTA (279 mg KHSO_5 /mL EDTA-Lösung, = 0,83 mmol KHSO_5) sowie 1,8 mL $\text{K}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ (281 g/L) bei Raumtemperatur hinzuge tropft und gerührt. Das Gemisch wird mit Toluol extrahiert, gewaschen, getrocknet und eingeengt.

11.3.4.4 Epoxidierung mit Dimethyldioxiran (DMD) nach Broshears^[160]

50 mg (0,14 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) werden in 840 μL (11,4 mmol) Aceton gelöst und mit 110 mg NaHCO_3 versetzt. Durch ein Septum

werden binnen 1 h 840 μL wässrige KHSO_5 -Lösung (267 g/L, = 1,47 mmol KHSO_5) bei -7°C hinzuge tropft und mehrere Stunden bei RT gerührt. Das Gemisch wird mit Toluol extrahiert, gewaschen, getrocknet und eingengt.

11.3.4.5 Epoxidierung mit (Trifluormethyl)methyldioxiran^[158]

Sämtliche Glasgeräte werden mit Spülmittel, nanopur-Wasser und wässriger EDTA-Lösung (250 mg/L) sorgfältig gereinigt und getrocknet. Für Schliffverbindungen wird Teflon[®]-Band verwendet. Zur Herstellung der KHSO_5 -Lösung^[244] werden 32,5 g KHSO_5 mit 60 mL EDTA (250 mg/L Nanopurwasser) bei RT 12 h gerührt, bei 7°C 12 h gelagert und filtriert. Zum Filtrat werden erneut 16 g KHSO_5 gegeben, gerührt, gekühlt und filtriert. Diese Prozedur wird noch zweimal mit je 16 g KHSO_5 wiederholt. Die erhaltene KHSO_5 -Lösung wird bei 7°C gelagert. Zur Herstellung der Trifluoracetonhydrat-Lösung werden 1,5 mL 1,1,1-Trifluoraceton (15,8 mmol) in 6,3 mL Wasser bei 0°C etwa 2 h intensiv gerührt, bis nur noch eine Phase vorliegt (ca. 2,5 M). Die Kühlfalle (Abb. 11-2, c) wird mit 1 M Thioanisol in Dichlormethan gefüllt.

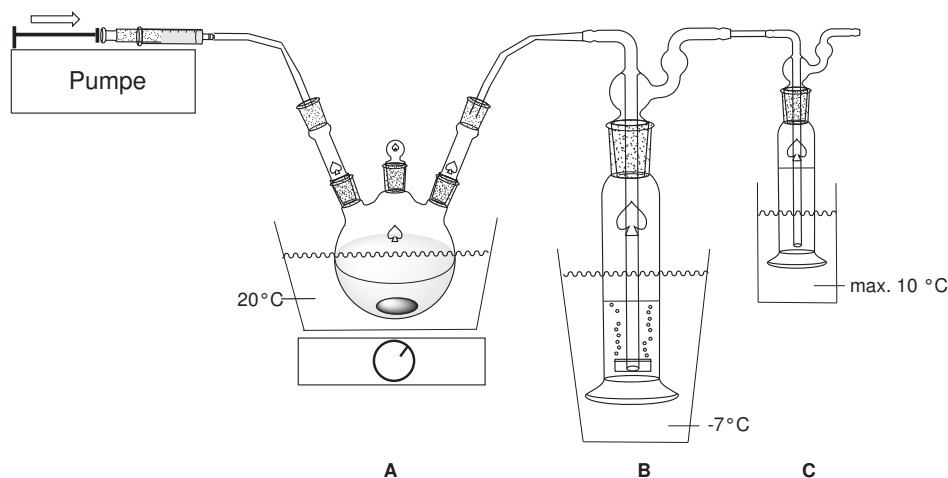


Abb. 11-2 Reaktionsaufbau zur Epoxidierung mit Dioxiranen (DMD/TFD) nach Mello *et al.*

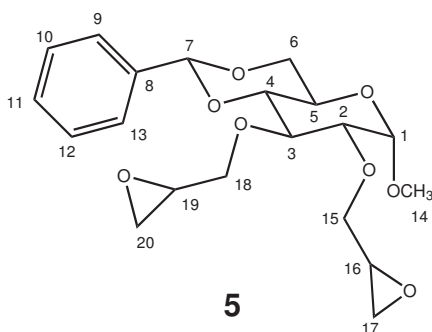
300 mg (0,83 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) werden in 50 mL frisch destilliertem trockenem CH_2Cl_2 gelöst und in die Waschflasche mit Fritte (Reaktionszone B) eingebracht. Hierzu werden etwa 3 mm hoch Glasperlen eingefüllt. Im Dreihalskolben (A) werden 22 g (0,258 mol) NaHCO_3 und 1,1,1-Trifluoracetonhydrat (15,8 mmol) vorgelegt. Bei -7°C werden 60 mL KHSO_5 (ca. 25 mL/h) gleichmäßig

zugetropft und das entstehende Gas in die Reaktionszone B übergetrieben. Nach Beendigung der Reaktion wird die Dichlormethan-Probelösung eingeeengt.

11.3.4.6 Epoxidierung mit Dimethyldioxiran (DMD) nach Mello^[158]

Die Durchführung erfolgt analog 11.3.4.5. Anstelle des 1,1,1-Trifluoracetons wird Aceton in Reaktionszone A vorgelegt.

11.3.5 Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxypropyl)- α -D-glucopyranosid (**5**)



450 mg (1,26 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) werden mit 8,1 mL Aceton (110 mmol) versetzt. Zum gelösten Edukt werden 1,09 g festes NaHCO₃ gegeben. Durch ein Septum werden 8,1 mL wässrige KHSO₅-Lösung ($c = 0,26$ g/mL, 13,9 mmol, 675 μ L/10 min) bei -7 °C hinzugegeben. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 24 h bei RT gerührt. Extraktion mit Toluol liefert **5**, welches nach Reinigung an Kieselgel (PE/ EtOAc 1:1, v/v) als feiner weißer Feststoff in 61 % Ausbeute erhalten wird.

R_f: Kieselgel, Petrolether/Ethylacetat 1/1, v/v = 0,33

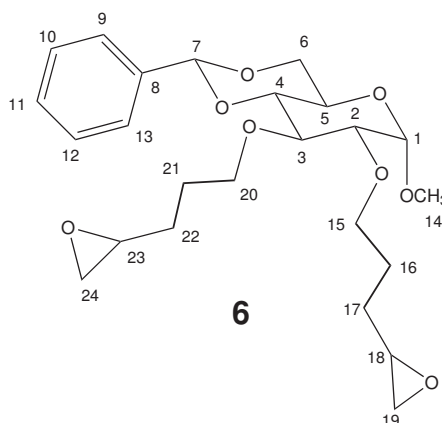
¹H-NMR (voa80171 TS 4) (400 MHz, CDCl₃ + TMS): δ (ppm) = 2,56-2,85 (m, 4 H, H-15a/b, 18a/b), 3,11-3,22 (m, 2 H, H-16, 19), 3,43-3,46 (m, 3 H, OCH₃ 14), 3,46-4,28 (m, 10 H, H-2, 3, 4, 5, 6a/b, 17a/b, 20a/b), 4,81-4,92 (1x dd, 1x d, 1 H, H-1, 2x $^3J_{1,2} = 3,72$ Hz, 1x $J = 1,36$), 5,54 (d, 1 H, H-7, Ph-CH, $J = 3,16$ Hz), 7,30-7,51 (m, 5 H, Ph H 9-13).

¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃ + TMS): δ (ppm) = 137,3 (PhC-8), 129,0 (PhC-11), 128,3 (PhC-9,13), 126,1 (PhC-10,12), 101,4 (Ph-CH-7), 99,2 (C-1), 82,0 (C-4), 80,6 (C-2), 79,4 (C-3), 73,6 (C-18), 71,9 (C-15), 69,1 (C-6), 62,3 (C-5), 55,4 (OCH₃, C-14), 50,8 (C-16, 19), 44,5 (C-17, 20)

ATR-IR, ν (cm^{-1}) 3065, 3001 (w, v, =C-H aromatisch), 2972, 2921, 2872, 2838 (w/m, v, C-H aliphatisch), 1451 (m, δ , CH_2 aliphatisch), 1374 (m, δ , CH_3), 1250 (w, Epoxid), 906 (s, Epoxid), 1085, 1046 (s, v, C-O-C), 750, 698 (s, δ , =C-H aromatisch, monosubst.)

MS (ESI, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 417,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 433,3 $[\text{M}+\text{K}]^+$, MS^2 417,4: m/z = 343,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Epoxypentanol, 311,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Benzaldehyd

11.3.6 Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(4,5-epoxypentyl)- α -D-glucopyranosid (**6**)



100 mg (0,24 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(pent-1-enyl)- α -D-glucopyranosid (**4**) werden mit 1,4 mL Aceton (19,4 mmol) versetzt. Zum gelösten Edukt werden 190 mg festes NaHCO_3 zugegeben. Durch ein Septum werden 1,4 mL wässrige KHSO_5 -Lösung (c = 0,26 g/mL, 2,4 mmol, 90 $\mu\text{L}/10$ min) bei -7°C hinzugegossen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 12 h bei RT gerührt. Extraktion mit Toluol liefert **6**, welches nach Reinigung an Kieselgel (PE/ EtOAc 1:1, v/v) als weißer Feststoff in 51 % Ausbeute erhalten wird.

R_f: Kieselgel, Petrolether/Ethylacetat 1/1, v/v = 0,28

$^1\text{H-NMR}$ (voa80360 TS 10) (400 MHz, CDCl_3 + TMS): δ (ppm) = 1,48-1,86 (m, 8 H, H-16a/b, 17a/b, 21a/b, 22a/b), 2,34-2,78 (m, 4 H, H-19a/b, 24a/b), 2,80-2,98 (m, 2 H, H-18, 23), 3,33-3,39 (m, 1 H, H-2?), 3,41-3,45 (m, 3 H, OCH_3 14), 3,46-3,53 (m, 1H, H-3?), 3,64-3,89 (m, 7 H, H-5, 6a/b, 15a/b, 20a/b), 4,26 (m, 1 H, H-4?), 4,81 (d, 1 H, H-1, $^3J_{1,2}$ = 3,67 Hz), 5,53 (s, 1 H, H-7, Ph-CH), 7,30-7,51 (m, 5 H, Ph H 9-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100,6 MHz, CDCl_3 + TMS): δ (ppm) = 137,3 (PhC-8), 127,7 (PhC-11), 127,0 (PhC-9,13), 124,8 (PhC-10,12), 100,1 (Ph-CH-7), 97,6 (C-1), 80,8 (C-4), 79,2 (C-2), 77,0

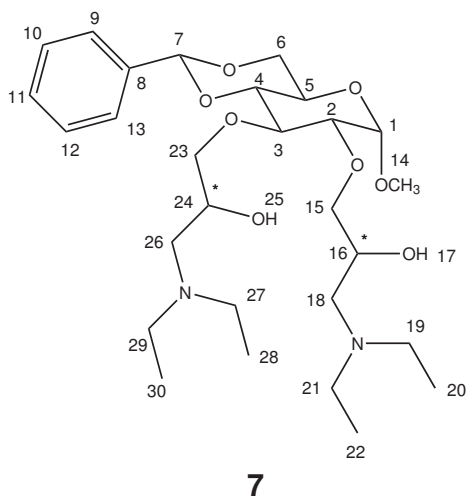
(C-3), 71,4 (C-15,20), 70,1 (C-6), 62,3 (C-5), 54,0 (OCH₃, C-14), 50,7 (C-18, 23), 45,7 (C-16, 21), 27,8 (C-22), 25,3 (C-17)

MS (ESI, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 473,4 [M+Na]⁺, 489,3 [M+K]⁺, MS² 473,3: m/z = 441,3 [M+Na]⁺ -MeOH, 371,2 [M+Na]⁺ -Epoxypropyl, 367,2 [M+Na]⁺ -Benzaldehyd

11.3.7 Nucleophile Ringöffnungsreaktionen

11.3.7.1 N-Nucleophile Ringöffnung mit Diethylamin

50 mg (0,13 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**5**) werden in einem 1 mL V-Vial mit 0,65 mL Acetonitril und 34 mg (0,32 mmol) LiClO₄ versetzt und einige Minuten bei RT gerührt. Es werden 127 μ L (1,27 mmol, 4,9 Äquivalente pro Epoxygruppe) Diethylamin hinzugetropft und bei 25-29 °C für 29 h gerührt. Das Gemisch wird nach Zugabe von Kochsalzlösung mit Diethylether extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Hochvakuum eingeeengt. Man erhält 50 mg (71 % d.Th.) des Rohproduktes Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(*N,N*-3-diethylamino-2-hydroxy)-propyl- α -D-glcp (**7**) als braunes Öl.



R_f: Kieselgel, EtOAc/Hexan 3:1, v/v = 0,09, Edukt **5**: R_f = 0,51.

¹H-NMR (AV 68) (400 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 0,82-0,98 (m, 12 H, H-20a-c, 22a-c, 28a-c, 30a-c), 2,23-2,60 (m, 12 H, H-18a/b, 19a/b, 21a/b, 26a/b, 27a/b, 29a/b), 3,33 (s, 3 H, OCH₃, H-14), 3,35-3,79 (m, 11 H, H-2, 3, 5, 6a/b, 15a/b, 16, 23a/b, 24), 4,06-4,18 (m, 1 H, H-4), 4,79-4,84 (m, 1 H, H-1), 5,47 (s, 1 H, H-7, Ph-CH), 7,18-7,41 (m, 5 H, Ph H 9-13).

¹³C-NMR (100,6 MHz, MeOH-d₄): δ (ppm) = 139,1 (PhC-8), 127,9-129,6 (PhC 9-13), 103,4 (Ph-CH-7), 100,5 (~3 C, Diastereomere, C-1), 80,5-83,5 (~11 C, Diastereomere, C-2, 3, 4), 75,8-77,8 (~8 C, Diastereomere, C-15, 23), 70,5 (C-6), 69,8-70,0 (4 C,

Diastereomere, C-16, 24), 64,2 (C-5), 57,5 (2 C, C-18, 26), 56,1 (OCH₃, C-14), 49,1 (4 C, C-19, 21, 27, 29), 12,2 (6 C, Diastereomere, C-20, 22, 28, 30).

MS (ESI-IT, positive Mode, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 541,5 [M+H]⁺, 563,5 [M+Na]⁺, MS² 541,5: 523,5 (-H₂O), 509,5 (-MeOH), 468,5 (-NHET₂), 394,5 (-NHET₂, -NEt₂), 362,5 (-MeOH, -NHET₂, -NEt₂), MS² 563,5: 490,3 (-NHET₂), 417,2 (-NHET₂, -NHET₂).

11.3.7.2 N-Nucleophile Ringöffnung mit Ammoniak/ Ammoniumhydroxid

30 mg (0,08 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**5**) werden in einem 3 mL V-Vial in 1,5 mL 2-Propanol gelöst, mit 770 μ L (6,4 mmol, 40 Äq./Epoxygruppe) NH₄OH (32 %) versetzt und bei 85 °C für 25 h gerührt. Das Gemisch wird nach Zugabe von Kochsalzlösung mit Diethylether extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Hochvakuum eingeeengt. Man erhält 13 mg eines klaren Films, der jedoch nicht das Produkt Methyl-2,3-di-*O*-(3-amino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**8**), sondern nur die einfach geöffneten Derivate Methyl-2-*O*-(3-amino-2-hydroxy)propyl-3-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**8a**) und Methyl-3-*O*-(3-amino-2-hydroxy)-propyl-2-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**8b**) enthält.

R_f: Kieselgel, EtOAc/Hexan 3:1, v/v = 0,0, Edukt **5**: R_f = 0,51.

MS (ESI-IT, positive Mode, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 412,5 [M+H]⁺ **8a/b**, 434,5 [M+Na]⁺ **8a/b**, MS² 412,5: 380,5 (**8a/b** -MeOH), 306 (**8a/b** -Benzaldehyd).

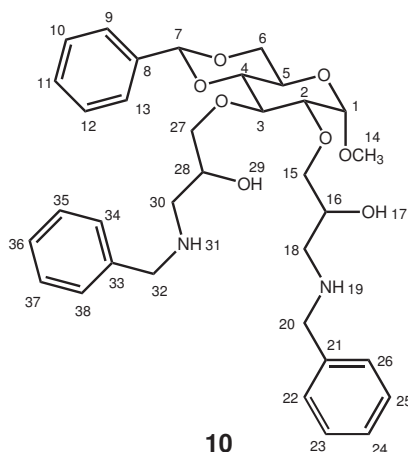
11.3.7.3 N-Nucleophile Ringöffnung mit Natriumazid

50 mg (0,13 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**5**) werden in 0,8 mL Methanol gelöst und mit 170 mg LiClO₄ (2 M) versetzt. Nach Zugabe von 132 mg NaN₃ (2,1 mmol, 8 Äq./Epoxygruppe) wird die Reaktionsmischung 72 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung wird das Produkt mit Diethylether extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Man erhält 49 mg des Rohproduktes aus Methyl-2,3-di-*O*-(3-azido-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**9**) und den einfach geöffneten Derivaten Methyl-2-*O*-(3-azido-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**9a**) und Methyl-3-*O*-(3-azido-2-hydroxy)-propyl-4,6-*O*-benzyliden-2-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**9b**) sowie als Nebenprodukte Mono-*O*-(3-azido-2-hydroxypropyl)-mono-*O*-(2,3-di-hydroxypropyl)-Derivate.

R_f: Kieselgel, Petrolether/EtOAc 1:5, v/v = 0,08/0,28/0,38/0,67, Edukt **5**: R_f = 0,63.

MS (ESI-IT, positive Mode, MeOH, 0,5 mg/mL) $m/z = 417$ $[M+Na]$ **5**, 438,5 $[M+H]^+$ **9a/b**, 460,5 $[M+Na]^+$ **9a/b**, 481,5 $[M+H]^+$ **9**, 503,5 $[M+Na]^+$ **9**, MS^2 481,5: 449,3 (**9**-MeOH), 375,2 (**9**-Benzaldehyd), 453,3 (**9**-N₂), 396 (**9**-N₃-CH₂-HC=O); MS^2 503,5: 475,2 (**9**-N₂), 418,2 (**9**-N₃-CH₂-HC=O).

11.3.7.4 N-Nucleophile Ringöffnung mit Benzylamin



50 mg (0,13 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**5**) werden in 0,7 mL Acetonitril gelöst und mit 111 μ L Benzylamin (1,00 mmol, 4 Äq./Epoxygruppe) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei 80 °C gerührt und das Produktgemisch Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**10**) Methyl-2-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-3-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**10a**) Methyl-3-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-2-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**10b**) nach Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung mit Diethylether extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt.

R_f: Kieselgel, Petrolether/Ethylacetat 1/5, v/v = 0,00/0,09; Edukt **5** = 0,67.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 2,25-2,60 (m, 3,3 H, H 18a/b, H 30a/b), 3,15-3,79 (m, 24,4 H, H-2, 3, 5, 6a/b, 15a/b, 16, 20a/b, 27a/b, 28, 32a/b, OCH₃ H-14a-c), 4,06-4,18 (m, 0,9 H, H-4), 4,79-4,84 (m, 0,8 H, H-1), 5,47 (m, 1 H, H-7, Ph-CH), 7,18-7,50 (m, 11,7 H, Ph H 9-13, H 33-38, H 21-26).

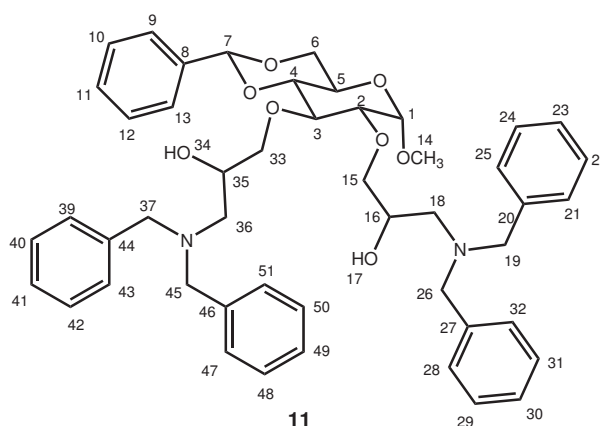
¹³C-NMR (100,6 MHz, CD₃OD): δ (ppm) = 143,2 (C 33), 140,5 (C 21), 139,1 (PhC-8), 126,5-129,6 (PhC 9-13, C 22-26, C 34-38), 103,4 (Ph-CH-7), 99 (Diastereomere, C-1),

80,5-83,5 (Diastereomere, C-2, 3, 4), 73-77 (Diastereomere, C-15, 27), , 69,8-70,0 (Diastereomere, C-16, 28), 69,2 (Diastereomere, C-6), 62,8 (C-5), 55,1 (Diastereomere, OCH₃, C-14), 53-54 (Diastereomere, C-20, 32), 51,5-52,0 (Diastereomere, C-18, 30).

MS (ESI-IT, positive Mode, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 502,4 [M+H]⁺ **10a/10b**, 609,5 [M+H]⁺ **10**, 631,4 [M+Na]⁺ **10**

11.3.7.5 N-Nucleophile Ringöffnung mit Dibenzylamin

54 mg (0,14 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**5**) werden in 0,75 mL Acetonitril gelöst und mit 27 mg (0,28 mmol, 1 Äq./Epoxygruppe) LiClO₄ versetzt. Anschließend werden in einer Portion 490 μ L Dibenzylamin (2,80 mmol, 10 Äq./Epoxygruppe) hinzugegeben und die Reaktionsmischung 48 h bei 60 °C gerührt. Das Produkt wird nach Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung mit Diethylether extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel (Hexan/Aceton, 3/1, v/v) erhält man 57 mg (48 % d. Th.) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(*N,N*-3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glcp (**11**).



R_f: Kieselgel, Hexan/Aceton, 3/1, v/v = 0,26

¹H-NMR (AV 77) (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ (ppm) = 2,58-2,33 (m, 4 H, H-18a/b, 36a/b), 3,25-3,93 (m, 22 H, H-2, 3, 5, 6a/b, 14, 15a/b, 16, 19a/b, 26a/b, 33a/b, 35, 37a/b, 45a/b), 4,18-4,22 (m, 1 H, H-4), 4,75-4,76 (m, 1 H, H-1), 5,55-5,57 (m, 1 H, H-7, Ph-CH), 7,15-7,52 (m, 25 H, Ph H 9-13, 21-25, 28-32, 39-43, 47-51).

¹³C-NMR (100,6 MHz, MeOH-*d*₄): δ (ppm) = 139-140 (PhC-8, 20, 27, 44, 46), 127-130 (PhC 9-13, 21-25, 28-32, 39-43, 47-51), 103 (Ph-CH-7), 99,5 (C-1), 79-83 (C-2, 3, 4, 5),

76,5 / 77,0 (C-15, 33), 69,6 (C-6), 69,0 (C-16, 35), 59,8 (C-19, 26, 37, 45), 57,2 (C-18, 36), 55,3 (OCH₃, C-14).

MS (ESI-IT, positive Mode, MeOH, 0,5 mg/mL) m/z = 789,6 [M+H]⁺ **11**, 812,6 [M+Na]⁺ **11**, 631,4 [M+Na]⁺ **10**

11.3.7.6 S-Nucleophile Ringöffnung mit Cysteamin

In einem 1 mL V-Vial werden 50 mg (0,13 mmol) Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(2,3-epoxy)propyl- α -D-glcp (**5**) in 0,5 mL trockenem Methanol gelöst, mit 460 μ L einer methanolischen Cysteamin-Stammlösung (91 mg/mL, 0,54 mmol, 2 Äq./ Epoxygruppe) versetzt und 48 h bei 60 °C gerührt. Methanol wird im Stickstoffstrom entfernt und das Produkt nach Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung und Einstellung des pH-Wertes auf 9-10 (2 M KOH) mit CHCl₃ extrahiert, getrocknet und eingeengt. Man erhält 72 mg des Rohproduktgemisches aus Methyl-2,3-di-*O*-(3-(2-aminoethylthio)-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**14**) und Methyl-mono-*O*-(3-(2-aminoethylthio)-2-hydroxy)-propyl-mono-*O*-(2,3-epoxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**14a**) als gelbe, ölige Substanz.

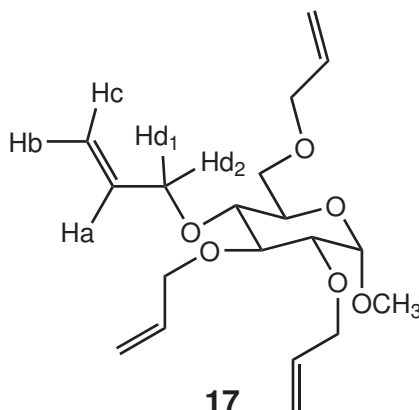
11.3.8 Hydrierung von Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)-propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**10**) und Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(*N,N*-3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glcp mit H₂, Pd/C

50 mg (0,08 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**10**) bzw. Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2,3-di-*O*-(*N,N*-3-dibenzylamino-2-hydroxy)propyl- α -D-glcp (**11**) werden in einem Reagenzglas mit 1 mL trockenem MeOH und 20 mg Pd/C (10 %) versetzt und mit 30 bar H₂ 48 h bei RT im Autoklaven gerührt. Der Katalysator wird über ein Membranfilter abgetrennt.

11.3.9 Hydrierung von Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)-propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp mit NH₄HCOO, Pd/C

60 mg (0,1 mmol) Methyl-2,3-di-*O*-(3-benzylamino-2-hydroxy)propyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**10**) werden mit 15 mL MeOH, 200 mg Pd/C (10 %) und 60 mg (0,94 mmol, 4,7 Äq./Benzylamin) Ammoniumformiat versetzt. Die Reaktionsmischung wird 4 h bei 80 °C unter Rückfluss gerührt. Der Katalysator wird über ein Falten- und anschließend ein Membranfilter abgetrennt.

11.3.10 Synthese von Methyl-2,3,4,6-tetra-*O*-allyl- α -D-glucopyranosid (17)



In einem 100 mL Schlenkkolben werden 805 mg (4,12 mmol = 16,48 mmol OH) trockenes **1** vorgelegt mit 20 mL trockenem DMSO 90 min bei RT gerührt. Danach werden ca. 2,0 g (49,44 mmol, 3 Äq./OH) frisch gemörserte NaOH hinzugegeben und für 60 min bei RT gerührt. Hiernach werden 4 mL AlCl₃ (49,44 mmol, 3 Äq./OH) binnen 5 min zugetropft und 24 h bei RT gerührt. Nach Wasserzugabe wird mit CH₂Cl₂ extrahiert und der Extrakt mit viel Wasser gewaschen, getrocknet (CaCl₂) und zur Trockene eingeeengt. Man erhält 1,38 g (3,91 mmol, 95 % der Th.) der farblosen und zähen Substanz **17**. Ein Teil der Substanz wird säulenchromatographisch an Kieselgel (MeOH/CH₂Cl₂ 10/1, v/v) gereinigt, wonach eine farblose und leicht gelbliche Flüssigkeit erhalten wird.

DC: Kieselgel, MeOH/CH₂Cl₂: R_f = 0,55

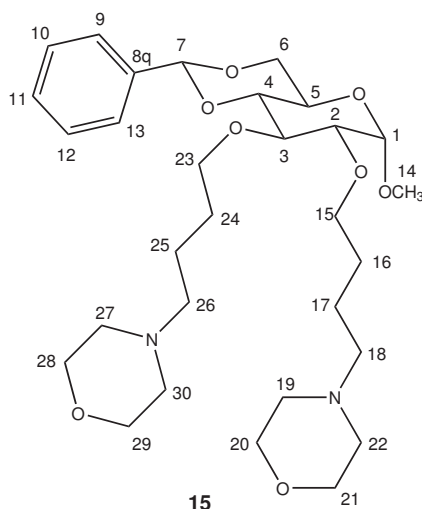
¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃): δ = 3.35-3.75 (m, 9 H, H-6a, H-6b, H-5, H-4, H-3, H-2, CH₃), 3.95-4.40 (m, 8 H, Hd₁, Hd₂), 4.77 (d, 1 H, H-1, ³J_{1,2} = 3,59 Hz), 5.10-5.35 (m, 8 H, H_b, H_c), 5.85-6.05 (m, 4 H, H_a).

MS (ESI, MeOH/CH₂Cl₂, 2/1, v/v), 0,5 mg/mL) m/z = 377,2 [M+Na]⁺, MS²: m/z = 335,2 [M+Na]⁺ - Propen, m/z = 293,1 [M+Na]⁺ - 2 x Propen.

11.3.11 Hydroaminomethylierung

In einem 50 mL Schlenkrohr werden unter Argon-Schutzatmosphäre 1,2 mg (3,0 μ mol = 0,1 mol-% bezogen auf allyl) [Rh(cod)₂]BF₄, 2,3 mg (3,8 μ mol = 0,13 mol-% bezogen auf allyl) Xantphos und 500 mg (1,38 mmol = 2,76 mmol allyl) Methyl-2,3-di-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden- α -D-glcp (**3**) mit je 15 mL abs. Methanol und abs. Toluol versetzt und 1 h zur Ausbildung des Rh-Xantphos-Komplexes bei RT gerührt. Die klare gelbe

Lösung wird unter Argon in einen 100 mL Autoklaven überführt, in welchem 43 mg (0,6 mmol) Ammoniumacetat bzw. 50 μL (0,4 mmol) Tetrafluorborersäure $\text{HBF}_4(\text{aq})$ (~50 %ig) und 0,3 mL (3,43 mmol = 1,2 Äq. / allyl) Morpholin bzw. 0,4 mL (3,6 mmol = 1,3 Äq. / allyl) Benzylamin vorgelegt sind. Der Autoklav wird mehrmals mit Argon gespült und dann 10 bar CO sowie H_2 ad 60 bar (entspricht Synthesegas $\text{CO} : \text{H}_2 = 1:1$) aufgegeben. Die Mischung wird 48 h bei 120 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird ein GC-MS von der Reaktionsmischung aufgenommen und anschließend die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt.



Methyl-4,6-O-benzyliden-2,3-di-O-(4-N-morpholinobutyl)- α -D-glcp (15)

MS: GC-MS (IfOK Rostock): 3 R_t 36,50 min, EI-MS: s. o.

MS: GC-MS (IfOK Rostock): R_t 47,45 min, EI-MS (rel. Intensität %): $m/z = 565$ (20) $[\text{M}^+ + \text{H}]$, 564 (52) $[\text{M}^+]$, 534 (18) $[\text{M}^+ - \text{HCHO}]$, 503 (7) $[\text{M}^+ - \text{HCHO}, - \text{OCH}_3]$, 464 (1) $[\text{M}^+ - 100]$, 429 (7), 341 (17), 253 (14), 158 (46) $[\text{Morph-Bu-O}^+]$, 142 (46) $[\text{Morph-Bu}^+]$, 100 (100) $[\text{Morph}=\text{CH}_2^+]$, 91 (8) $[\text{C}_7\text{H}_7^+]$, 77 (3) $[\text{C}_6\text{H}_5^+]$.

GC-MS, Säule DB 5, 30 m, Temperatur-Programm 70 °C(3 min) \rightarrow 10 °C/min \rightarrow 320 °C (5 min): $R_t = 31,01$ min, EI-MS $m/z = 564$ (45) $[\text{M}^+]$, 534 (18) $[\text{M}^+ - \text{HCHO}]$, 503 (3) $[\text{M}^+ - \text{HCHO}, - \text{OCH}_3]$, 464 (0,4) $[\text{M}^+ - 100]$, 429 (1), 341 (1), 253 (2), 158 (35) $[\text{Morph-Bu-O}^+]$, 142 (43) $[\text{Morph-Bu}^+]$, 100 (100) $[\text{Morph}=\text{CH}_2^+]$, 91 (5) $[\text{C}_7\text{H}_7^+]$, 77 (2) $[\text{C}_6\text{H}_5^+]$.

MS (ESI-IT-MS): $m/z = 587$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 565 $[\text{M} + \text{H}]^+$, MS^2 587: $m/z = 446$ $[\text{M} + \text{Na} - 141]^+ = [\text{M} + \text{Na} - (\text{O} - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2)_2 - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH})]^+$

Ausbeute: 19 mg (0,034 mmol, 3 % d. Th.)

R_f: Kieselgel, MeOH / CH₂Cl₂ (2/1, v/v) 0,55.

EA: Theorie: C (63,8), H (8,57), N (4,96); bestimmt: C (41,7), H (6,23), N (3,10).

¹H-NMR (voa77496) (300 MHz, MeOH-*d*₄): δ (ppm) = 1,45-1,55 (m, 8 H, H-16a/b, 17a/b, 24a/b, 25a/b), 2,00-2,45 (m, 13 H, H-2, 3, 5, 6a/b, 19a/b, 22a/b, 27a/b, 30a/b), 3,10-3,70 (m, 19 H, H-15a/b, 18a/b, 20a/b, 21a/b, 23a/b, 26a/b, 28a/b, 29a/b, -OCH₃ H-14_{a,b,c}), 4,10 (m, 1 H, H-4), 4,80 (m, ~1 H, unter MeOH, H-1), 5,47 (m, 1 H, H-7, Ph-CH), 7,20-7,40 (m, 5 H, Ph H 9-13).

¹³C-NMR (75,4 MHz, MeOH-*d*₄): δ (ppm) = 140 (C_q-8), 129 (C-11), 128 (C-10, 12), 126 (C-9, 13), 102 (Ph-CH-7), 99,3 (C-1), 82,2 (C-4), 80,7 (C-3), 78,8 (C-2), 72,0 (C-6), 70,0 (C-15, 23), 67,0 (C-20, 21, 28, 29), 63,0 (C-5), 59,0 (C-18, 26), 54,8 (OCH₃, C-14), 54,5 (C-19, 22, 27, 30), 29,0 (C-16, 24), 23,0 (C-17, 25).

Methyl-4,6-*O*-benzyliden-2(3)-allyl-3(2)-*O*-(4-*N*-morpholinobutyl)- α -D-glcp (15a3 n)

GC-EI-MS (IfOK Rostock) R_t 46,30 min, EI-MS (rel. Intensität %): m/z = 463 (28) [M⁺], 429 (8), 405 (10), 341 (14), 281 (20), 207 (32), 158 (50) [O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂CH₂CH₂-CH₂-O⁺], 142 (21) [O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂CH₂CH₂-CH₂⁺], 100 (100) [O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂⁺].

MS (ESI-MS): m/z = 464,6 [M+H]⁺, 486,4 [M+Na]⁺, MS² 486,4: m/z = 345,2 [M+Na -141,3]⁺ = [M+Na -(O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂-CH₂-CH₂-CH)]⁺, 142 [O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂]⁺

Methyl-4,6-*O*-benzyliden-3(2)-allyl-2(3)-*O*-(4-*N*-morpholinobutyl)- α -D-glcp (15a2 n)

GC-EI-MS (IfOK Rostock) R_t 46,50 min, EI-MS (rel. Intensität %): m/z = 463 (44) [M⁺], 429 (20), 405 (17), 355 (11), 343 (13), 341 (39), 331 (15), 327 (28), 281 (58), 253 (34), 207 (82), 191 (12), 158 (52) [O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂CH₂CH₂-CH₂-O⁺], 147 (14), 142 (25), 100 (100) [O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂⁺], 91 (14) [C₆H₅⁺], 77 (9) [C₆H₅-CH₂⁺]

MS (ESI-MS): m/z = 464,6 [M+H]⁺, 486,4 [M+Na]⁺, MS² 486,4: m/z = 345,2 [M+Na -141,3]⁺ = [M+Na -(O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂-CH₂-CH₂-CH)]⁺, 142 [O-(CH₂-CH₂)₂-N-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂]⁺

**Methyl-2-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden-3-*O*-(2-methyl-3-morpholino-)propyl- α -D-glcp
(15a3 iso)**

GC-EI-MS (IfOK Rostock) 45,10 min m/z = 463 (5) $[M]^+$, 429 (7), 405 (6), 355 (5), 343 (5), 341 (15), 331 (4), 327 (7), 281 (20), 253 (11), 207 (28), 198 (11), 191 (4), 158 (100) $[O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2CH_2CH_2-CH_2-O^+]$, 147 (6), 142 (17), 100 (74) $[O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2^+]$, 91 (7) $[C_6H_5^+]$, 77 (4) $[C_6H_5-CH_2^+]$.

MS (ESI-MS): m/z = 464,6 $[M+H]^+$, 486,4 $[M+Na]^+$, MS^2 486,4: m/z = 345,2 $[M+Na-141,3]^+ = [M+Na-(O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2-CH_2-CH_2-CH)]^+$, 142 $[O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2]^+$

**Methyl-3-*O*-allyl-4,6-*O*-benzyliden-2-*O*-(2-methyl-3-morpholino-)propyl- α -D-glcp
(15a2 iso)**

GC-EI-MS (IfOK Rostock) 45,57 min m/z = 463 (5) $[M]^+$, 429 (16), 405 (12), 355 (8), 343 (8), 341 (21), 331 (9), 327 (14), 281 (38), 253 (22), 207 (52), 198 (8), 191 (8), 158 (100) $[O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2CH_2CH_2-CH_2-O^+]$, 147 (11), 142 (15), 135 (11), 100 (66) $[O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2^+]$, 91 (8) $[C_6H_5^+]$, 77 (3) $[C_6H_5-CH_2^+]$

MS (ESI-MS): m/z = 464,6 $[M+H]^+$, 486,4 $[M+Na]^+$, MS^2 486,4: m/z = 345,2 $[M+Na-141,3]^+ = [M+Na-(O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2-CH_2-CH_2-CH)]^+$, 142 $[O-(CH_2-CH_2)_2-N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2]^+$

11.3.12 Epoxidierung von Octakis[2,3,6-tri-*O*-allyl]- γ -cyclodextrin (18)

Die Epoxidierung und Synthese der $KHSO_5$ -Lösung in EDTA sowie Trifluoracetonhydrat erfolgt analog 11.3.4.5. 171 mg (0,0758 mmol = 1,819 mmol Doppelbindungen DB) Octakis[2,3,6,tri-*O*-allyl]- γ -cyclodextrin (**18**) werden in 50 mL CH_2Cl_2 gelöst und in die Waschflasche mit Fritte (Reaktionszone B, siehe Abb. 11-2) eingebracht. Hierzu werden etwa 3 mm hoch Glasperlen eingefüllt. Im Dreihalskolben (A) werden 25,6 g (0,37 mol) $NaHCO_3$ und 1,1,1-Trifluoracetonhydrat (16,3 mmol, ca. 9 Äq./DB) vorgelegt. Bei -7 °C werden 60 mL $KHSO_5$ -Lösung (ca. 20 mL/h) gleichmäßig zugetropft und das entstehende Gas in die Reaktionszone B übergetrieben. Nach Abnahme einer Probe wurde der verbliebene Rest ein zweites Mal wie beschrieben mit TFD epoxidiert. Nach Beendigung der Reaktion wird die Dichlormethan-Probelösung eingeengt, wonach 240 mg einer

farblosen, öligen Substanz aus Cyclodextrinderivaten verschiedenen Epoxidierungsgrades erhalten werden.

DC: Kieselgel, Petrolether/EtOAc, 2/1 (v/v): $R_f = 0,0/ 0,06/ 0,14/ 0,48/ 0,57/ 0,63/ 0,68/ 0,76/ 0,83$, Edukt **18:** $R_f = 0,83$

$^1\text{H-NMR}$ (300.1 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{TMS}$), Rohproduktgemisch: δ (ppm) = 2,25 (m, 9,53 H, Oxiran CH/CH_2), 2,70 (m, 12,58 H, Oxiran CH/CH_2), 3,0-4,6 (m, 96 H, H-2,3,4,5,6a/b, -O- CH_2 -), 5,0-5,4 (m, 29,99 H, H-1, $=\text{CH}_2$), 5,95 (m, 9,5 H, $-\text{CH}=\text{C}$)

MS (ESI, MeOH, 0,5 mg/mL) $m/z = 1151, 1160, 1168, 1176, 1184, 1192, 1200, 1208, 1216, 1224, 1230, 1238, 1246, 1254, 1262, 1272, 1311, 1327, 1343$, jeweils $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$

11.3.13 Synthese von Dextranderivaten mit NaOH als Base

50-200 mg (0,3-1,2 mmol AGU) des zuvor getrockneten Dextrans werden unter Rühren in trockenem DMSO ($c = 10\text{-}30 \text{ mg/mL}$) ggf. unter schwachem Erwärmen gelöst. Über einen Pulvertrichter wird zu der klaren Lösung frisch gemörserte NaOH (0,3-6 Äq./OH, Peralkylierung: mind. 5 Äq./OH) gegeben und 5-15 min gerührt. Zu der deprotonierten Dextranlösung werden 0,3-6 Äq./OH (Peralkylierung mind. 5 Äq./OH) der folgenden Alkylierungsmittel hinzugegeben:

Allyldextrane:	Allylbromid, Allylchlorid oder Allyliodid
Pentenyl-dextrane:	5-Brom-1-penten
Methyl-dextrane:	Iodmethan
Deuteromethylmethyl-dextrane:	Iodmethan- d_3
Methoxyethylallyl-dextrane:	(2-Bromomethyl)methylether
Deuteropropylallyl-dextrane:	1-Brompropan- d_7

Das Gemisch wird mehrere Stunden bis Tage bei RT gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird überschüssiges Alkylierungsmittel im Hochvakuum entfernt und das Dextranderivat durch Dialyse (MWCO abhängig von Dextrangröße 1, 3.5 oder 12-14 kDa) gegen Wasser isoliert und anschließend gefriergetrocknet. Für Peralkylierungen wird die Alkylierung nach Entfernen des ersten Alkylierungsmittels im Hochvakuum mit der halben Menge an Base und Alkylierungsmittel 1-2 Mal wiederholt.

11.3.14 Synthese von Dextranderivaten mit Lithium-Dimsyl als Base

50-200 mg (0,3-1,2 mmol AGU) des zuvor getrockneten Dextrans werden unter Rühren in trockenem DMSO ($c = 10\text{-}30\text{ mg/mL}$) ggf. unter schwachem Erwärmen unter Stickstoff gelöst. Zu der klaren Lösung werden 0,75-2,5 Äq./OH (Peralkylierung: mind. 3 Äq./OH) frisch hergestellte Lithium-Dimsyllösung (1,6 M, hergestellt durch Eintropfen von X mL einer 5% igen Methyl-Lithiumlösung in Diethylether zu X mL abs. DMSO und Entfernen des Diethylethers im Stickstoffstrom) gegeben und 15-20 min gerührt. Zu der hochviskosen, deprotonierten Dextranlösung werden 0,75-2,5 Äq./OH (Peralkylierung mind. 3 Äq./OH) der folgenden Alkylierungsmittel hinzugegeben:

Allyldextrane:	Allylbromid, Allylchlorid
Pentenyl-dextrane:	5-Brom-1-penten
Methyl-dextrane:	Iodmethan
Methoxyethylallyldextrane:	(2-Bromomethyl)methylether
Deuteriopropylallyldextrane:	1-Brompropan- d_7

Die Aufarbeitung erfolgt wie unter 11.3.13 beschrieben.

11.3.15 Epoxidierung von Allyldextran mit Dioxiranen (DMD/TFD)

Die Herstellung der KHSO_5 -Lösung in EDTA, der Trifluoracetonhydrat-Lösung sowie der Versuchsaufbau erfolgt wie unter 11.3.4.5 beschrieben. 150 mg (0,61 mmol AGU) Allyldextran AV 159 (DS 2,05) werden 3 Tage in 50 mL trockenem CH_2Cl_2 bei RT gelöst und in die Waschflasche mit Fritte (Reaktionszone B, siehe Abb. 11-2) eingebracht. Im Dreihalskolben (A) werden 38 g (0,45 mol) NaHCO_3 und 1,1,1-Trifluoracetonhydrat (11 mmol, ca. 9 Äq./DB) vorgelegt. Bei $-7\text{ }^\circ\text{C}$ werden 40 mL KHSO_5 -Lösung (ca. 40 mL/h) gleichmäßig zugetropft und das entstehende (Trifluormethyl)methyldioxiran (TFD) in die Reaktionszone B übergetrieben. Anschließend werden in Reaktionszone A 3 mL Aceton hinzugegeben und erneut 60 mL KHSO_5 -Lösung (ca. 40 mL/h) gleichmäßig zugetropft. Das nun entstehende Dimethyldioxiran (DMD) wird erneut in Zone B geleitet. Nach Beendigung der Reaktion wird die Probelösung eingengt. Etwa 25 mL werden zur Trockene eingengt und charakterisiert, die verbliebenen 25 mL werden bis auf 5 mL eingengt und zur nucleophilen Ringöffnung mit Cysteamin (siehe 11.3.16) eingesetzt.

Elementaranalyse (w-%): C (54,09), H (6,65)

ATR-IR: siehe Abschnitt 6.7.2.

11.3.16 Nucleophile Ringöffnung von epoxidiertem Allyldextran mit Cysteamin

Die nach 11.3.15 epoxidierte Allyldextran-Lösung (ca. 100 mg/5 mL Dichlormethan) wird im Schlenkkolben mit 10 mL trockenem DMSO und 228 mg Cysteamin, gelöst in 10 mL DMSO, versetzt und 7 d bei 33 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung (pH 7) mit 2 mL Na-Acetat/Essigsäurepuffer (pH 4) versetzt und die Lösung 3 Mal gegen Na-Acetat/Essigsäurepuffer (pH 4) und 5 Mal gegen demin. Wasser dialysiert (MWCO 14kDa) und gefriergetrocknet. Man erhält 102 mg eines gelben, feinkörnigen Dextranderivats ($DS_{\text{cysteamin}}$ 0,08).

Elementaranalyse (w-%): C (54,21), H (6,90), N (0,44), S (1,06)

ATR-IR: siehe Abschnitt 6.7.2.

11.3.17 Radikalische Addition von Cysteamin an Allyldextran

Katalyse durch Ammoniumpersulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)

In einem 25 mL Schlenkkolben werden 102 mg (0,41 mmol AGU) Allyldextran AV 159 (DS 2,05) im Stickstoffstrom mit 4 mL trockenem DMSO versetzt und 12 h bei RT gerührt. Hierzu werden 125 mg (1,62 mmol) Cysteamin, gelöst in 2 mL DMSO, sowie 40 mg (0,18 mmol) Ammoniumpersulfat gegeben. Die Mischung wird bei 50 °C für 35 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung (pH 9) mit 2 mL Na-Acetatpuffer (pH 4) versetzt und die Lösung 3 Mal gegen Na-Acetat/Essigsäurepuffer (pH 4) und 5 Mal gegen demin. Wasser dialysiert (MWCO 14kDa) und gefriergetrocknet. Man erhält 95 mg eines weißen Dextranderivats ($DS_{\text{cysteamin}}$ 0,12).

Elementaranalyse (w-%): C (59,10), H (7,35), N (0,68), S (2,02)

ATR-IR: siehe Abschnitt 6.8.

Katalyse durch Azobisisobutyronitril (AIBN)

In einem 25 mL Schlenkkolben werden 150 mg (0,62 mmol AGU) Allyldextran AV 159 (DS 2,05) im Stickstoffstrom mit 15 mL trockenem 1,4-Dioxan versetzt und 3 d bei RT gerührt. Hierzu werden 2,07 g (26,8 mmol, 19 Äq./Doppelbindung) Cysteamin sowie 40 mg (0,24 mmol, 0,17 Äq./Doppelbindung) AIBN gegeben und die Mischung bei 75 °C unter Rückfluss für 21 h gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung gegen demin. Wasser dialysiert (MWCO 14kDa) und gefriergetrocknet. Man erhält 102 mg eines weißen Dextranderivats ($DS_{\text{cysteamin}}$ 0,26).

Elementaranalyse (w-%): C (58,11), H (7,68), N (1,41), S (3,33)

ATR-IR: siehe Abschnitt 6.8.

11.4 Derivatisierung für die GC-Analyse

Allyldextrane: Partiell propylierte Sorbitpropionate

1. Methanolyse

1-2 mg Polysaccharidderivat werden in einem 1 mL V-Vial mit 0,9 mL einer 1,5 M methanolischen HCl (hergestellt durch Eintropfen von 8 mL Acetylchlorid zu 67 mL eisgekühltem, trockenem Methanol) für 90 min auf 90 °C im Heizblock erhitzt und anschließend mit Methanol codestilliert.

2. Hydrierung

3-4 mg Pd/C (10%) werden in einem Reagenzglas vorgelegt und das in 700 µL MeOH (HPLC) aufgenommene Methanolysat bei RT mit 30 bar H₂ für mind. 8 h gerührt. Nach Zugabe von 600 µL Methanol wird der Katalysator durch Membranfiltration (0,45 µm) abgetrennt und die Lösung im Stickstoffstrom zur Trockene eingeeengt.

3. Hydrolyse

Das Produktgemisch wird mit 900 µL 2 M TFA für 2 h auf 120 °C erhitzt. Die Säure wird anschließend durch Codestillation mit Toluol (5 x zur Trockene) entfernt.

4. Reduktion

Das Produktgemisch wird mit 500 µL frisch bereiteter NaBD₄/2 M NH₃ (11 mg/mL)-Lösung für 2 h auf 60 °C erhitzt. Nach Zugabe von 7 Tropfen konz. Propionsäure, erfolgt die Codestillation mit 15%iger methanolischer Propionsäure, um überschüssiges Borat zu entfernen.

5. Propionylierung

Zum Produktgemisch werden 20 µL Pyridin und 300 µL Propionsäureanhydrid gegeben und 4 h auf 90 °C erhitzt.

6. Aufarbeitung

Nach Zugabe von gesättigter NaHCO₃ Lösung (bis kein CO₂ mehr aufsteigt) erfolgt die Extraktion mit 3 x je 10 mL CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen werden 1 x mit ges. NaHCO₃ Lösung, 1x mit kalter 0,1 M HCl und 2x mit dest. Wasser gewaschen, über CaCl₂ getrocknet und eingeeengt.

Acetylierung

Zum Produktgemisch werden 20 μL Pyridin und 200 μL Essigsäureanhydrid gegeben und 2 h auf 90 °C erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgt wie unter 6. angegeben.

Trimethylsilylierung

Nach der Methanolyse wird die Probe mit 100 μL BSTFA, 10 μL Trimethylchlorsilan und 5 μL Pyridin versetzt und 1 h auf 100 °C erhitzt. Anschließend wird mit Dichlormethan verdünnt.

Pentenyl-dextrane: partiell pentylierte Sorbitacetate

Die Derivatisierung erfolgt analog nach den oben beschriebenen Schritten:

Methanolyse – Hydrierung – Hydrolyse - Reduktion – Acetylierung- Aufarbeitung.

Abbauarten für ESI-MS-Oligomeranalysen

Partielle Methanolyse

Für eine partielle Methanolyse wird je nach gewünschtem Abbaugrad die Konzentration der methanolischen HCl erniedrigt (z.B. 0,1 M) und/oder die Abbauzeit verringert (z.B. 10 min).

Partielle Hydrolyse

Für eine partielle Methanolyse wird je nach gewünschtem Abbaugrad die Konzentration der TFA erniedrigt (z.B. 0,1 M) und/oder die Abbauzeit verringert (z.B. 10 min).

Partieller Reduktiver Abbau

5 mg Polysaccharidderivat werden in ca. 250 μL CH_2Cl_2 gelöst, mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMS-Triflat, 1,5 Äq./AGU) und Triethylsilan (TES, 5-10 Äq./AGU) versetzt und 5 min bei RT reagieren gelassen. Nach Zugabe von Pyridin (12 μL) wird die organische Phase mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über CaCl_2 getrocknet und mit MeOH verdünnt.

11.5 Enzymatischer Abbau von Dextran und Dextranderivaten

11.5.1 Inkubation mit Dextranase

20-30 mg Dextranderivat werden in einem 5 mL V-Vial in 1,8 mL Citratpuffer (pH 5,7) dispergiert, mit 1,55 mL (186 U) Dextranase-Suspension (120 U/mL) versetzt und das Gesamtgewicht des V-Vials bestimmt. Die Mischung wird 7 d bei 52 °C unter schwachem Rühren im Heizblock inkubiert. Nach 10 min Erhitzen auf 110 °C wird die Gewichts Differenz (Verdunstung) bestimmt und die Lösung anschließend membranfiltriert (0,45 µm). Von diesem Filtrat werden, ggf. nach Verdünnung, 200 µL zur enzymatischen Glucosebestimmung eingesetzt. Zur Bestimmung der Blindwerte werden Dextranase ohne Dextran sowie Dextran ohne Dextranase ebenso behandelt und die Glucosekonzentration bestimmt.

11.5.2 Enzymatische Glucosebestimmung

Die enzymatische Glucosebestimmung erfolgt nach Anleitung des Enzymkits, (ENZYTECTM D-Glucose, Fa. Sci-Diagnostics) mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase. Messgröße ist NADPH, dessen Extinktion bei 340 nm bestimmt wird.

11.6 Substanzlisten

Substanzliste Allyldextrane

Nr.	M _w * [kDa]	LM	Base Art	Äq. Base /OH		All-X X =	AllX-Äquiv. /OH		AOX	Reaktion T (t)	Aufar- beitung	DS (GC)	E [mg]	A [mg]	Ausbeute [#] [% d. Th.]
				1	2 (3)		1	2 (3)							
AV 5	500	DMSO	NaOH	3,60		Br	0,94			RT (3d)	1)	0,37	32	45	129
AV 6	500	DMSO	NaOH	2,45		Br	0,94			RT (3d)	1)	0,79	32	44	115
AV 7	500	DMSO	NaOH	1,49		Br	0,90			RT (3d)	1)	0,81	34	43	105
AV 8	500	DMSO	NaOH	1,76		Br	0,86			RT (2d)	1)	0,60	35	41	102
AV 11	500	H ₂ O	NaOH	0,67	1,18	Br	0,93	0,93		46°C (16h)	1)	-	33	-	-
AV 12	500	H ₂ O	NaOH	2,20	1,93	Br	1,04	1,04		46°C (16h)	1)	-	29	-	-
AV 14	500	DMSO	NaOH	5,00		Br	2,00			RT (4d)	1)	0,54	54	69	113
AV 15	500	DMSO	NaOH	6,00		Br	3,00			RT (4d)	1)	0,74	56	78	118
AV 23 D	500	DMSO	NaOH	1,20		Br	1,14			RT (2d)	1)	0,40	103	145	128
AV 24	500	DMSO	NaOH	1,00	0,45	Br	1,00	0,50		RT (2d)	1)	0,57	507	-	-
AV 30	500	DMSO	Dim syl	1,50		Br	1,50			RT (1d)	1)	0,49	156	188	108
AV 31	500	DMSO	Dim syl	1,00		Br	1,00			RT (3d)	1)	0,33	151	193	118
AV 82	500	DMSO	NaOH	1,50		Br	1,50	0,75		RT (2d)	2)	-	105	-	-
AV 84	500	H ₂ O	NaOH 33%	-		Br	1,50	0,75		RT (45h), 30°C (3d)	1)	-	213	225	-
AV 88 D	500	DMSO	NaOH	6,00		Br	6,00			RT (3d)	1)	2,19	81	-	-
AV 107	500	DMSO	NaOH	3,00		I	3,16			RT (2d)	1), 3)	-	282	317	-
AV 112	500	DMSO	NaOH	4,97		Br	4,97		BHT	RT (2d)	1)	-	201	-	-
AV 120	500	DMSO	NaOH	5,00		Cl	5,0			35°C	1)	2,42	201	419	130
AV 121	500	DMSO	NaOH	5,00		Cl	5,0		Hy.	RT	1)	2,51	217	486	138
AV 122	500	DMSO	NaOH	4,90		Cl	4,9		Hy.	RT	1)	1,28	204	357	133
AV 123	40	DMSO	NaOH	5,30		Br	4,6			RT	1)	2,06	186	112	40
AV 124	500	DMSO	NaOH	5,00	5,0 (5,0)	Cl	5,0	5,0 (5,0)		RT	1)	1,16	118	342	225
AV 125	500	DMSO	NaOH	5,00		Cl	5,0			35°C	2)	2,13	200	378	124
AV 126	500	DMSO	NaOH	5,00		Cl	5,0		Hy.	RT	1)	2,44	214	371	108
AV 127	6	DMSO	NaOH	6,00		Cl	5,8			RT	1)	1,92	160	346	147
AV 128	40	DMSO	NaOH	5,70		Cl	5,4			RT	1)	2,01	173	501	194
AV 130	40	DMSO	NaOH	5,00		Cl	5,0		Hy.	RT	1)	2,41	210	283	84

Fortsetzung Substanzliste Allyldextrane

Nr.	M _w * [kDa]	LM	Base Art	Basenäquivalente		All-X X =	AllX-Äquiv. /OH		AOX	Reaktion T (t)	Aufar- beitung	DS (GC)	E [mg]	A [mg]	Ausbeute [#] [% d. Th.]
				1	2 (3)		1	2 (3)							
AV 131	6	DMSO	NaOH	5,00		Cl	5,0		Hy.	RT	1)	2,25	199	318	103
AV 132	6	DMSO	Dim syl	2,50		Cl	2,5		Hy.	RT	1)	0,95	200	257	104
AV 133	500	DMSO	Dim syl	2,50		Cl	2,5		Hy.	RT	1)	0,98	212	325	123
AV 134	40	DMSO	Dim syl	2,50		Cl	2,5		Hy.	RT	1)	1,04	203	343	134
AV 136	6	DMSO	NaOH	0,33		Cl	0,33			RT (2d)	1)	0,13	263	161	59
AV 137	6	DMSO	NaOH	0,66		Cl	0,66			RT (2d)	1)	0,08	249	182	72
AV 138	40	DMSO	NaOH	0,33		Cl	0,33			RT (2d)	1)	0,10	264	241	89
AV 139	40	DMSO	NaOH	0,66		Cl	0,66			RT (2d)	1)	0,12	257	246	93
AV 140	500	DMSO	NaOH	0,33		Cl	0,33			RT (2d)	1)	0,09	245	264	105
AV 141	500	DMSO	NaOH	0,66		Cl	0,66			RT (2d)	1)	0,17	259	310	115
AV 159	40	DMSO	NaOH	3,00		Cl	3,00			RT (4d)	1)	2,05	2525	4145	109
AV 160	40	DMSO	NaOH	1,20		Cl	1,20			RT (3d)	1)	1,46	2466	3965	118
AV 161	6	DMSO	NaOH	1,80		Cl	1,80			RT (3d)	1)	2,13 / 0,74	2658	3804	106
AV 162	15-25	DMSO	NaOH	1,80		Cl	1,80			RT (4d)	1)	1,81	2392	6775	196
AV 163	500	DMSO	NaOH	1,80		Cl	1,80			RT (4d)	1)	2,31	2454	3949	102
AV 170	15-25	DMSO	Dim syl	0,75		Cl	0,75			RT (3d)	1)	0,86	168	147	72
AV 171	40	DMSO	Dim syl	0,75		Cl	0,75			RT (3d)	1)	-	156	159	-
AV 172	500	DMSO	Dim syl	0,75		Cl	0,75			RT (3d)	1)	-	146	152	-

* Herstellerangabe

LM Lösungsmittel

1) Dialyse, Gefriertrocknung

2) Fällung

3) Extraktion Dichlormethan

Hy. Hydrochinonzusatz

BHT Butylhydroxytoluol-Zusatz

E Einwaage Dextran

A Auswaage Allyldextran

scheinbare DS-basierte Ausbeute

Substanzliste Allyl-Amylosen

Nr.	M _w * [kDa]	LM	Base Art	Base Äq./OH	All-Br Äq./OH	Reaktion T (t)	Aufar- beitung	DS	E [mg]	A [mg]	Ausbeute [#] [% d. Th.]
AV 23 A	960	DMSO	NaOH	1,20	1,14	RT (2d)	Dialyse, GT	n.b.	78	109	-
AV 88 A	960	DMSO	NaOH	6,00	6,00	RT (3d)	Dialyse, GT	2,60	80	150	114

Substanzliste Allyl-Stärken

Nr.	M _w * [kDa]	LM	Base Art	Base Äq./OH	All-Br Äq./OH	Reaktion T (t)	Aufar- beitung	DS	E [mg]	A [mg]	Ausbeute [#] [% d. Th.]
AV 23 S	>1000	DMSO	NaOH	1,20	1,14	RT (2d)	Dialyse (3.5kDa), GT	-	103	84	-
AV 88 S	>1000	DMSO	NaOH	6,00	6,00	RT (3d)	Dialyse (3.5kDa), GT	2,21	82	127	100

Substanzliste Pentenyl-Dextrane

Nr.	M _w * [kDa]	LM	Base Art	Base Äq./OH	5-Br-1-penten Äq./OH	Reaktion T (t)	Aufar- beitung	DS	E [mg]	A [mg]	Ausbeute [#] [% d. Th.]
AV 90	500	DMSO	NaOH	13,6	5,0	RT (2d) ¹⁾	Dialyse, GT	0,67	72	112	121
AV 91	500	DMSO	NaOH	7,8	3,0	RT (2d) ¹⁾	Dialyse, GT	0,60	70	119	136
AV 94	500	DMSO	Li-dimsyl	1,3	1,3	RT (1d) ¹⁾	Dialyse, GT	0,70 ²⁾	75	108	111
AV 96	500	DMSO	Li-dimsyl	1,0	1,3	RT (1d) ¹⁾	Dialyse, GT	-	100	151	-
AV 98	500	DMSO	Li-dimsyl	1,2	1,2	RT (2d) ^{1,3)}	Dialyse, GT	-	77	111	-
AV 105	500	DMSO	NaOH	3,8	1,0	RT (1d)	Extraktion CH ₂ Cl ₂	-	494	449	-

Substanzliste Pentenyl-Amylosen

Nr.	M _w * [kDa]	LM	Base Art	Base Äq./OH	5-Br-1-penten Äq./OH	Reaktion T (t)	Aufar- beitung	DS	E [mg]	A [mg]	Ausbeute [#] [% d. Th.]
AV 92	960	DMSO	NaOH	13,6	5,0	RT (2d) ¹⁾	Dialyse, GT	0,98	72	122	120
AV 93	960	DMSO	NaOH	7,8	3,0	RT (2d) ¹⁾	Dialyse, GT	1,54	72	128	108
AV 95	960	DMSO	Li-dimsyl	1,3	1,3	RT (1d) ¹⁾	Dialyse, GT	-	76	99	-
AV 97	960	DMSO	Li-dimsyl	1,0	1,3	RT (1d) ¹⁾	Dialyse, GT	-	103	118	-
AV 99	960	DMSO	Li-dimsyl	1,2	1,2	RT (2d) ^{1,3)}	Dialyse, GT	-	76	81	-

* Herstellerangabe , LM = Lösungsmittel

1) Reaktion, Dialyse, Gefriertrocknung ohne Licht; 2) DS berechnet aus ¹H-NMR-Spektrum; 3) Zusatz von 1 Äq./OH TBAB

E: Einwaage, A: Auswaage Polysaccharid(derivat)

scheinbare DS-basierte Ausbeute

12 Anhang

ECR-Faktoren

R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	M	ECR	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	M	ECR	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	M	ECR
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	519	1490	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	435	890	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	435	890
Pro	Pr	Pro	Pro	Pro	Pro	505	1545	Ac	Pn	Ac	Ac	Ac	Ac	463	1245	Ac	Me	Ac	Ac	Ac	Ac	407	845
Pro	Pro	Pr	Pro	Pro	Pro	505	1545	Ac	Ac	Pn	Ac	Ac	Ac	463	1245	Ac	Ac	Me	Ac	Ac	Ac	407	845
Pro	Pro	Pro	Pr	Pro	Pro	505	1545	Ac	Ac	Ac	Pn	Ac	Ac	463	1245	Ac	Ac	Ac	Me	Ac	Ac	407	845
Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pr	505	1535	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Pn	463	1235	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Me	407	835
Pro	Pr	Pr	Pro	Pro	Pro	491	1600	Ac	Pn	Pn	Ac	Ac	Ac	491	1600	Ac	Me	Me	Ac	Ac	Ac	379	800
Pro	Pr	Pro	Pr	Pro	Pro	491	1600	Ac	Pn	Ac	Pn	Ac	Ac	491	1600	Ac	Me	Ac	Me	Ac	Ac	379	800
Pro	Pro	Pr	Pr	Pro	Pro	491	1600	Ac	Ac	Pn	Pn	Ac	Ac	491	1600	Ac	Ac	Me	Me	Ac	Ac	379	800
Pro	Pr	Pro	Pro	Pro	Pr	491	1590	Ac	Pn	Ac	Ac	Ac	Pn	491	1590	Ac	Me	Ac	Ac	Ac	Me	379	790
Pro	Pro	Pr	Pro	Pro	Pr	491	1590	Ac	Ac	Pn	Ac	Ac	Pn	491	1590	Ac	Ac	Me	Ac	Ac	Me	379	790
Pro	Pro	Pro	Pr	Pro	Pr	491	1590	Ac	Ac	Ac	Pn	Ac	Pn	491	1590	Ac	Ac	Ac	Me	Ac	Me	379	790
Pro	Pr	Pr	Pr	Pro	Pro	477	1655	Ac	Pn	Pn	Pn	Ac	Ac	519	1955	Ac	Me	Me	Me	Ac	Ac	351	755
Pro	Pr	Pr	Pro	Pro	Pr	477	1645	Ac	Pn	Pn	Ac	Ac	Pn	519	1945	Ac	Me	Me	Ac	Ac	Me	351	745
Pro	Pro	Pr	Pr	Pro	Pr	477	1645	Ac	Ac	Pn	Pn	Ac	Pn	519	1945	Ac	Ac	Me	Me	Ac	Me	351	745
Pro	Pr	Pro	Pr	Pro	Pr	477	1645	Ac	Pn	Ac	Pn	Ac	Pn	519	1945	Ac	Me	Ac	Me	Ac	Me	351	745
Pro	Pr	Pr	Pr	Pro	Pr	463	1700	Ac	Pn	Pn	Pn	Ac	Pn	547	2300	Ac	Me	Me	Me	Ac	Me	323	700

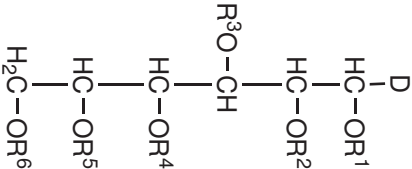
Pr = Propyl (aus allyll)

Pro = Propionyl

Pn = Pentyl (aus pentenyl)

Ac = Acetyl

Me = Methyl



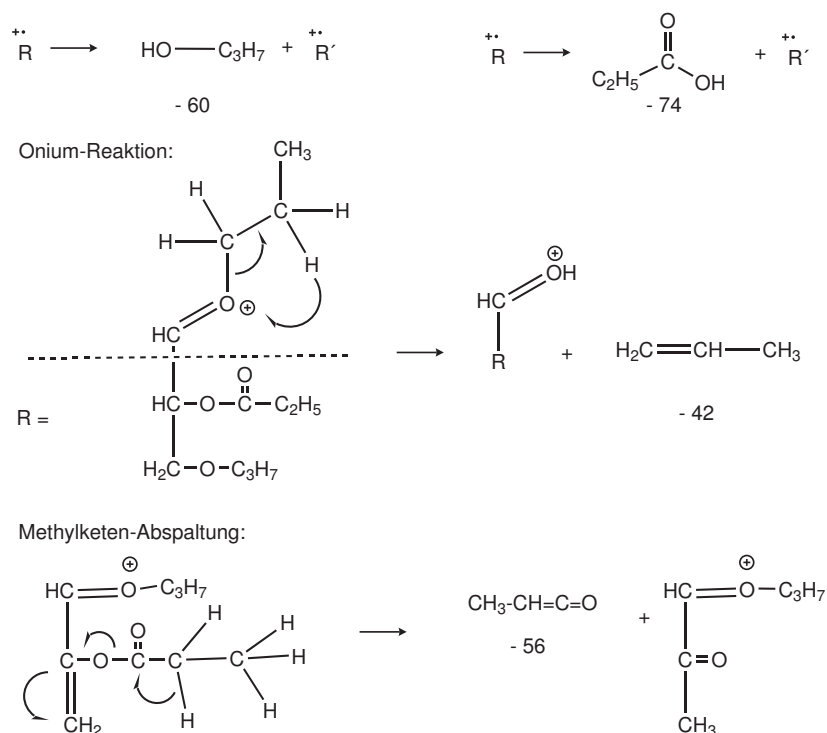
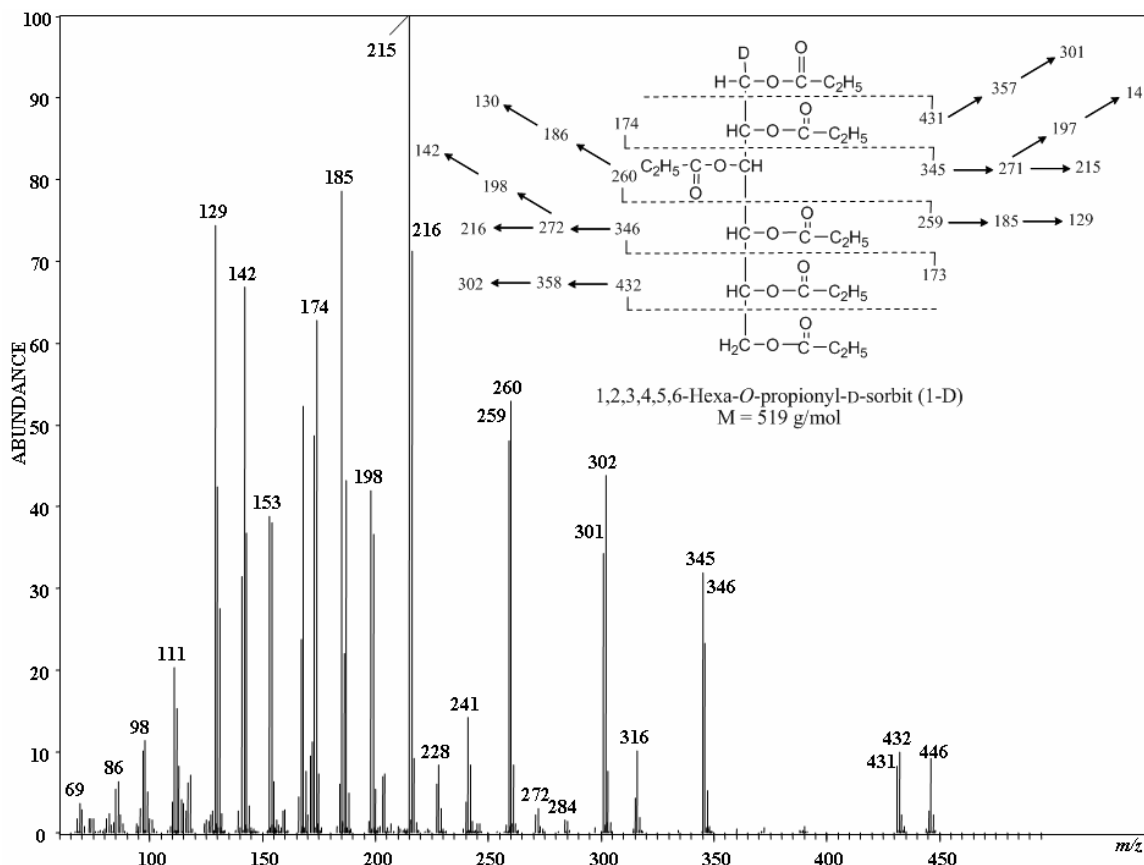
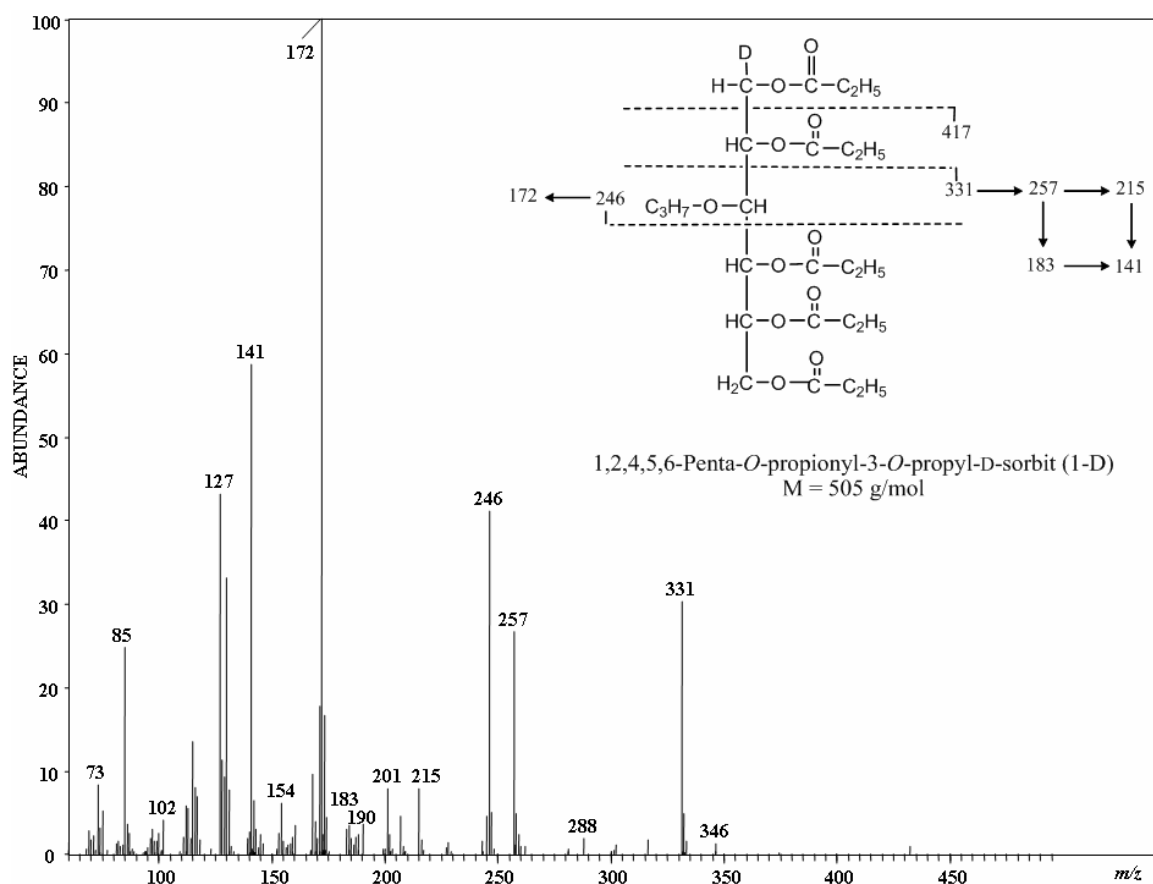
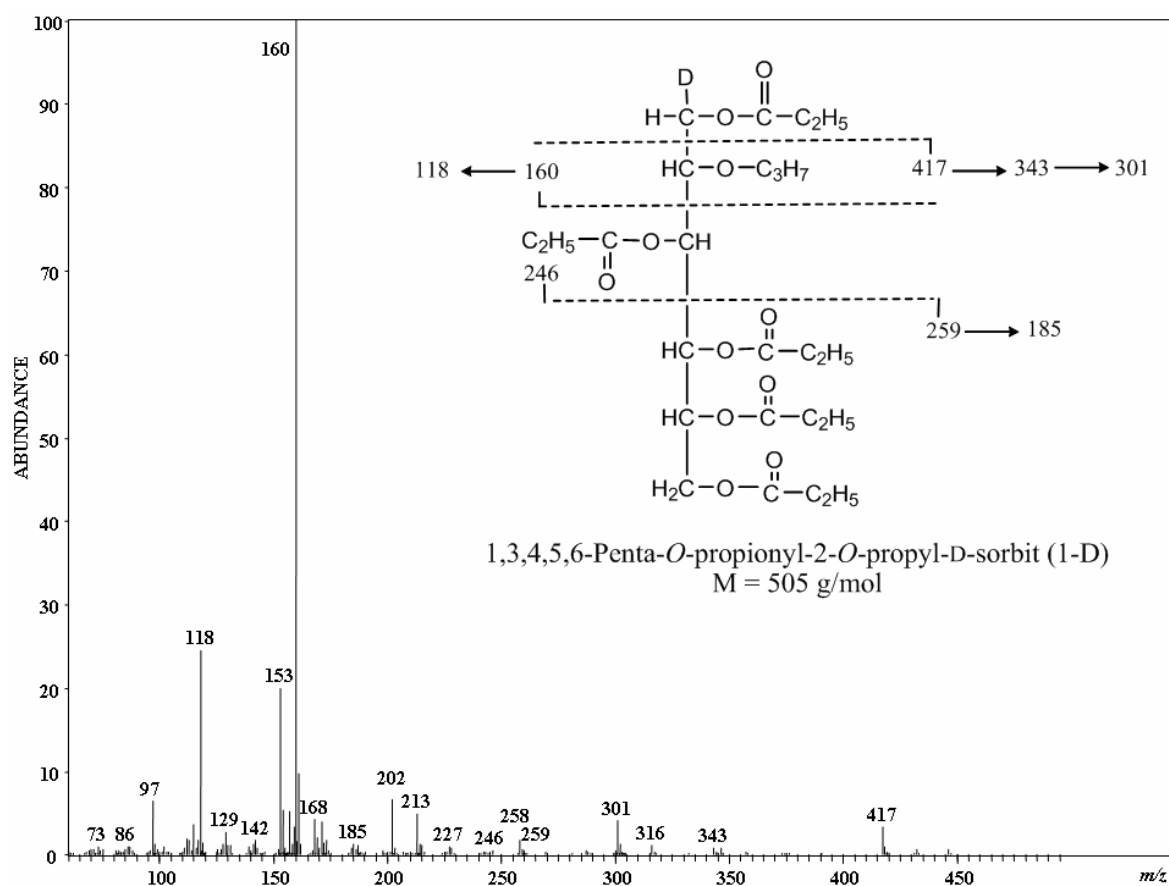
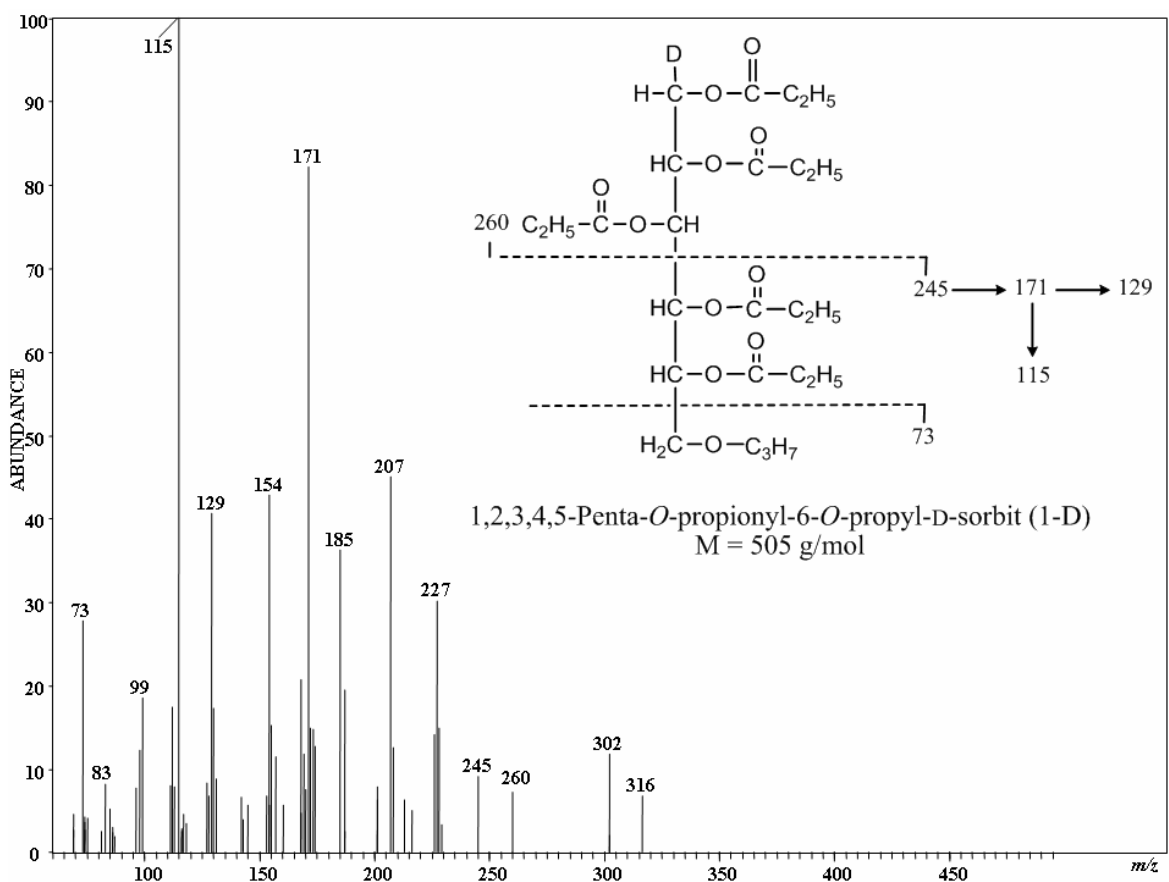
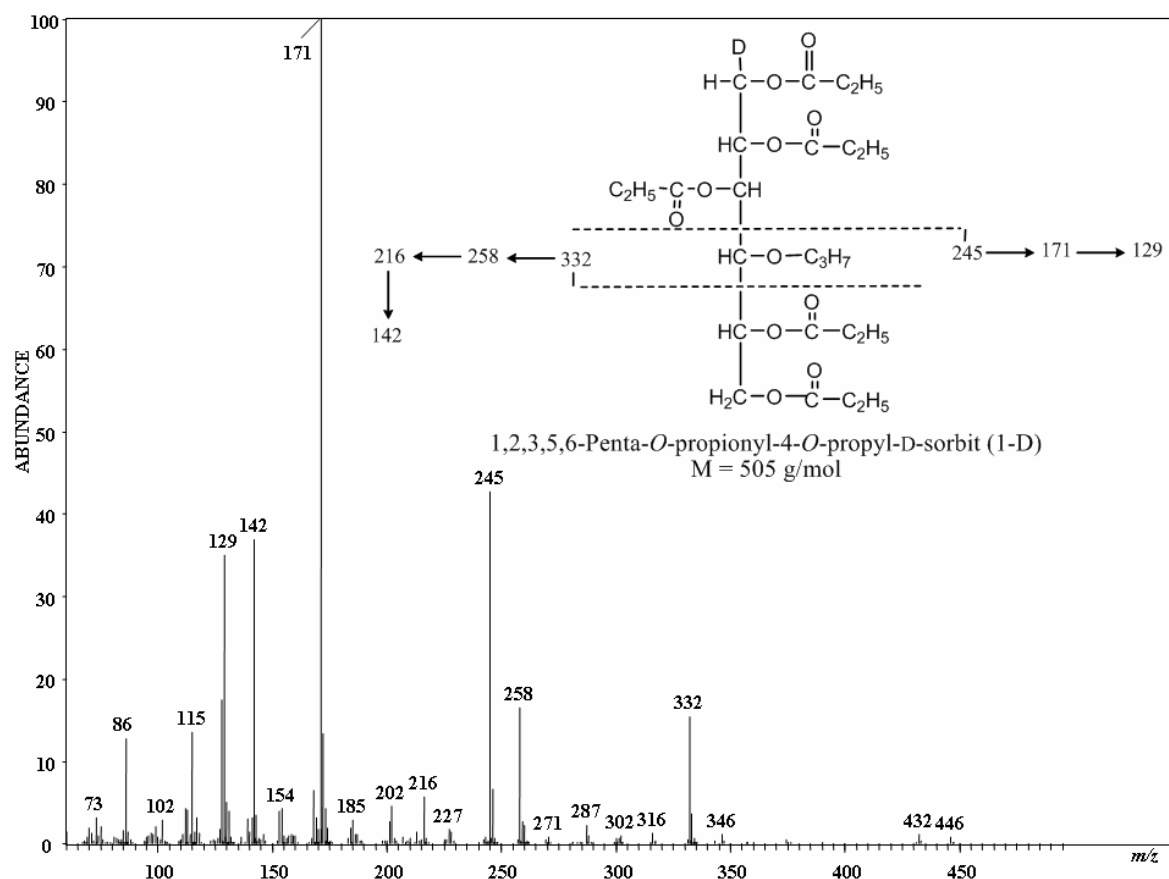
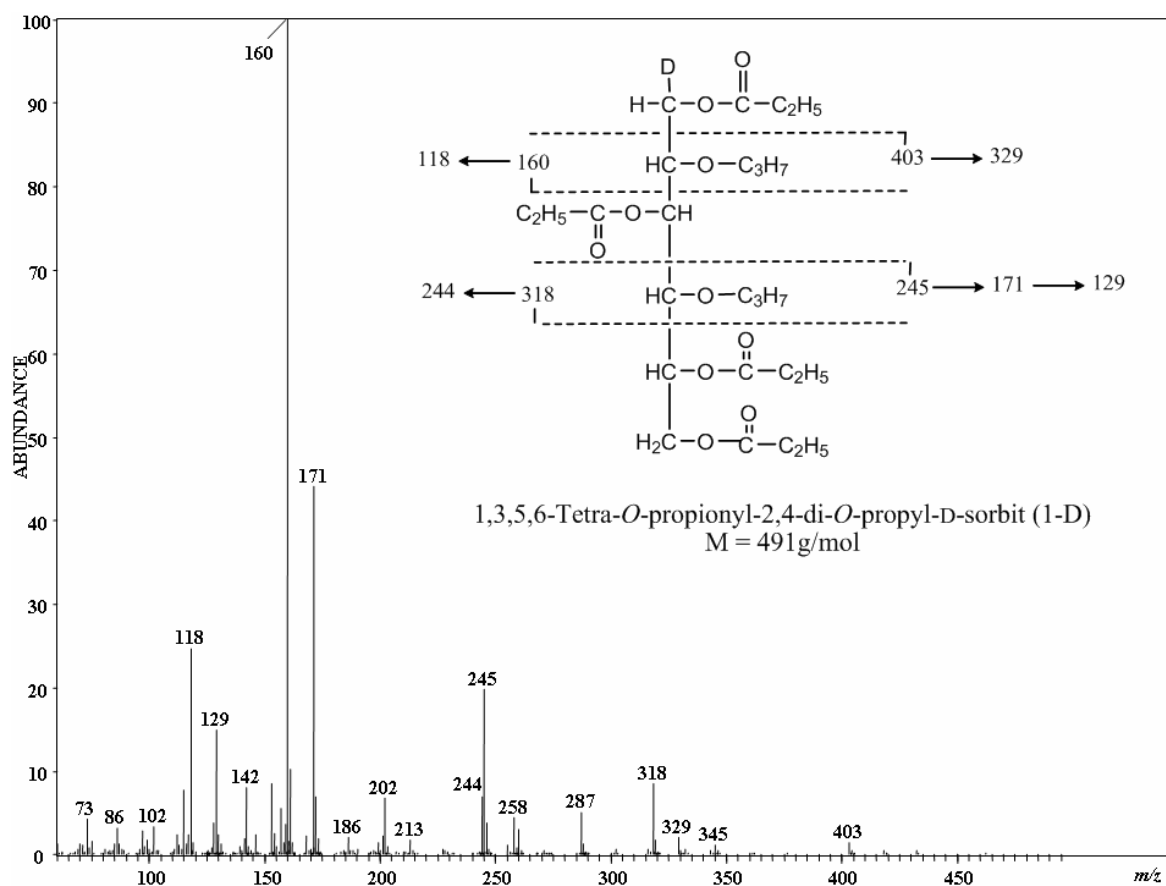
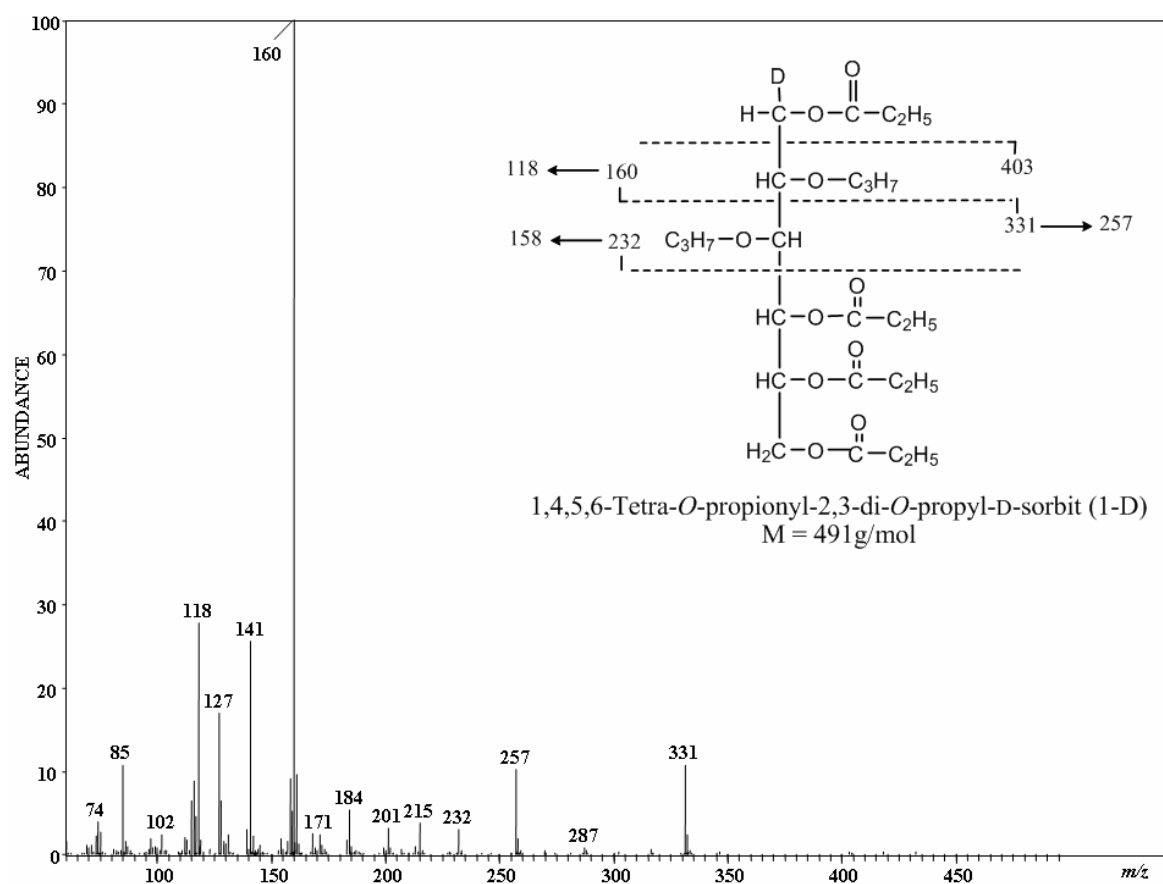


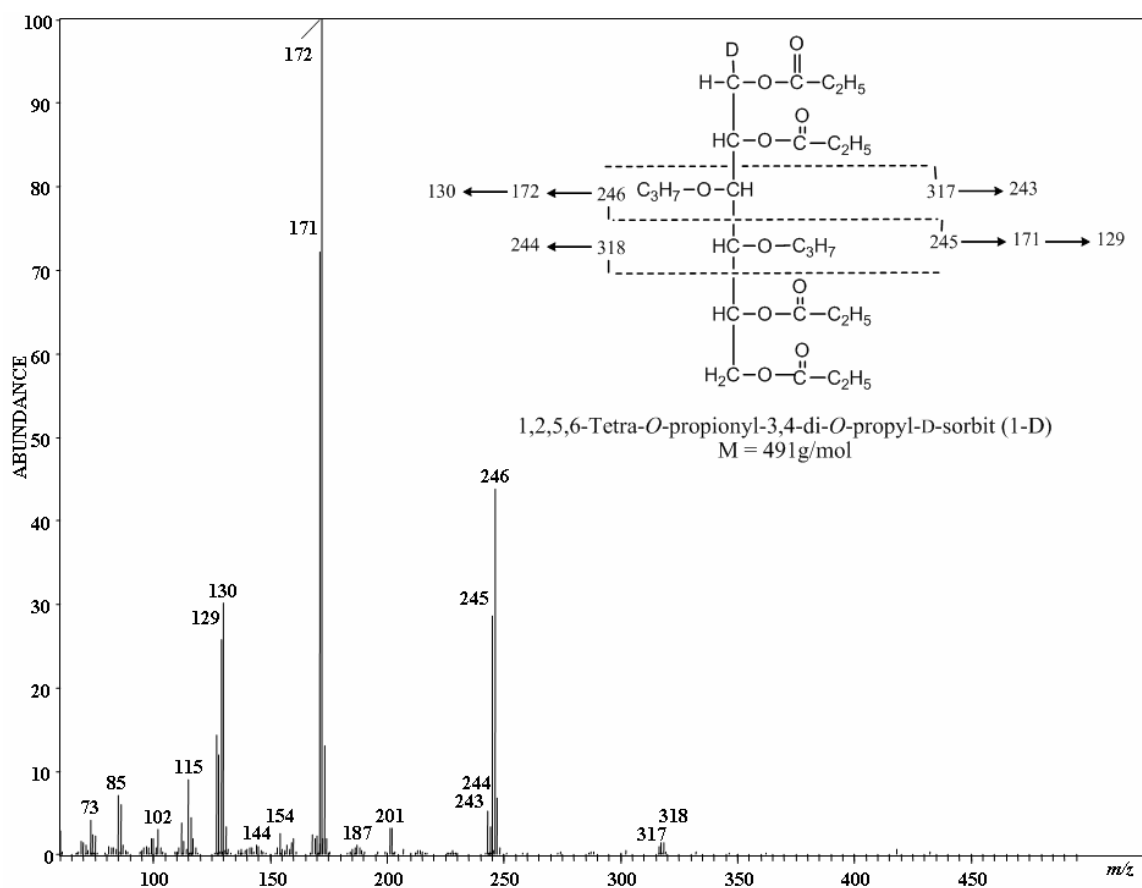
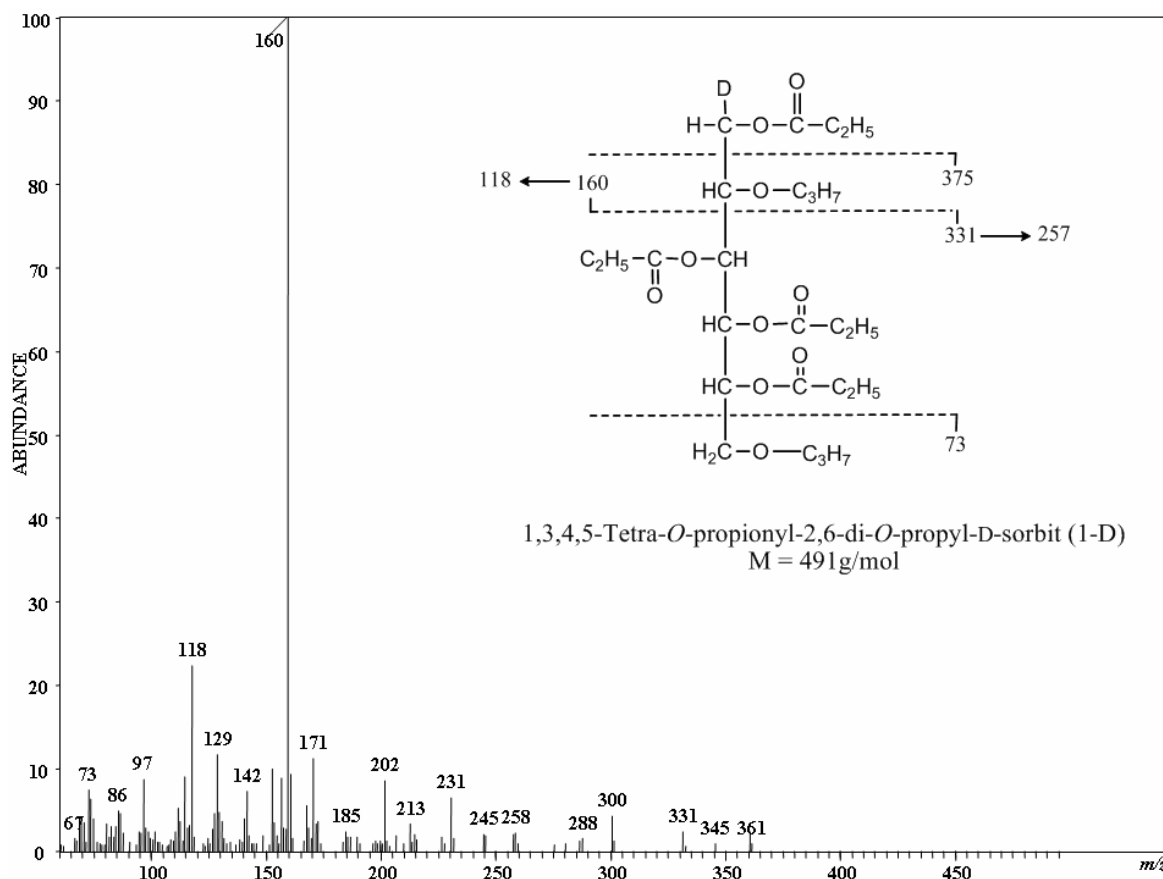
Abb. 12-1 EI-MS-Sekundärfragmentierungen von partiell propylierten Sorbitpropionaten.

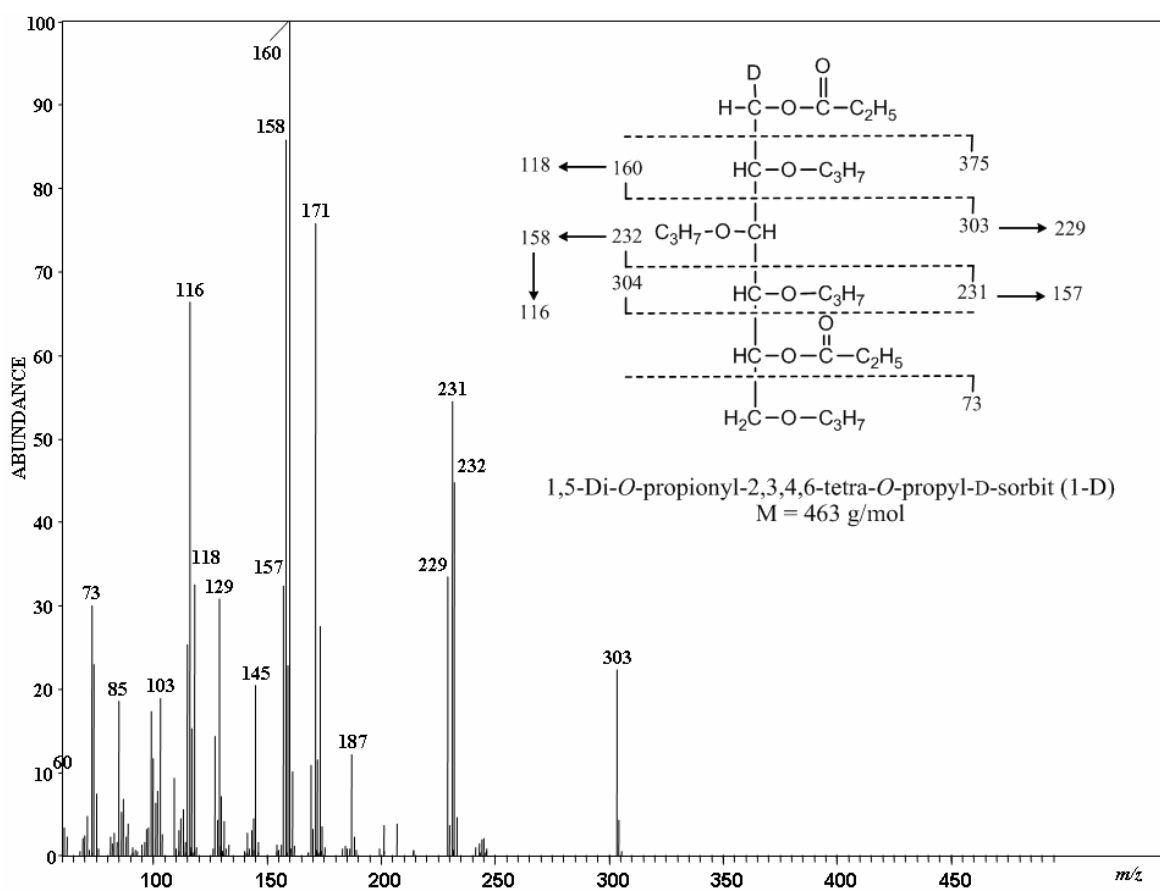
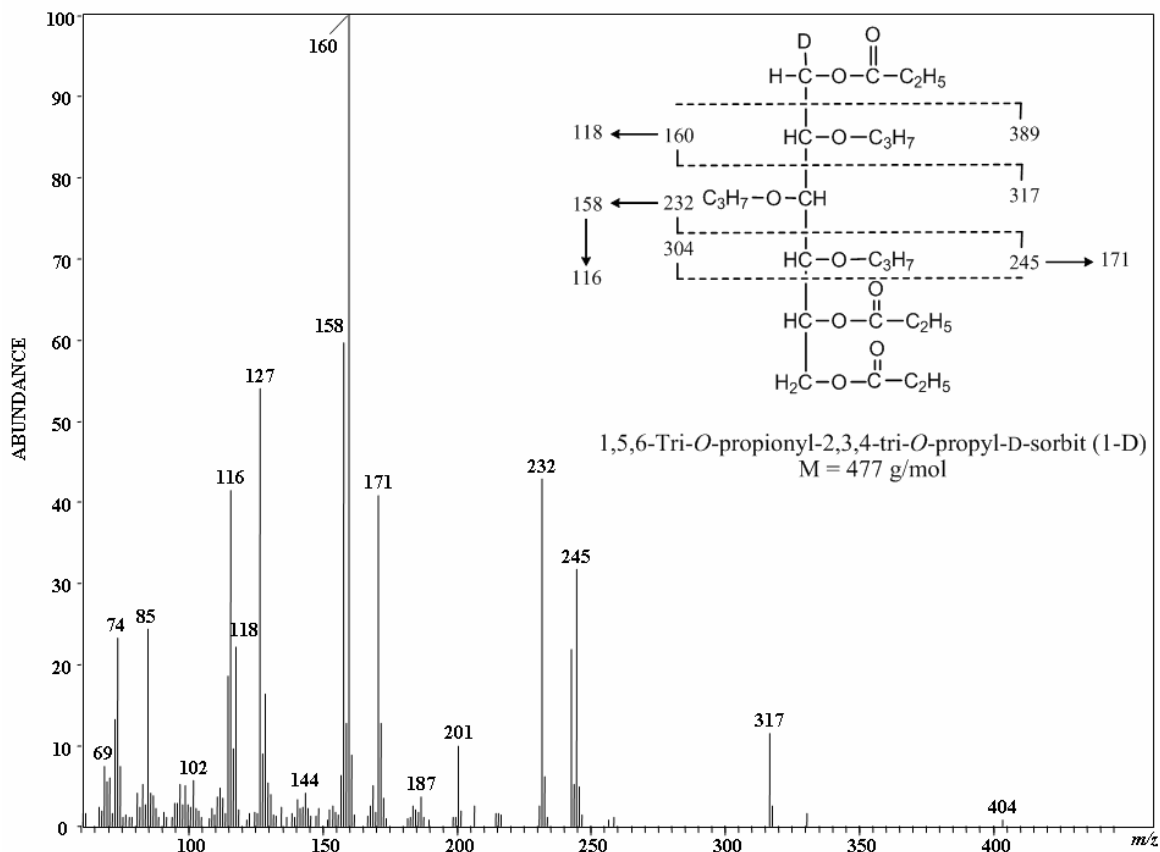
EI-Massenspektren von partiell propylierten Sorbitpropionaten (Allyldextrane)











13 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABN	p-Aminobenzonitril
abs.	absolut
AGU	anhydroglucose unit (Anhydroglucoseeinheit)
AiBN	Azobisisobutyronitril
All, all	Allyl
ATR	attenuated total reflectance (abgeschwächte Totalreflexion)
BME	2-Bromethyl-methylether
BHT	Butylhydroxytoluol
CE	Kapillarelektrophorese
CMC	Carboxymethylcellulose
Bn	Benzyl
δ	relative Verschiebung zu TMS [ppm]
d	Tag(e)
Da	Dalton
DB-1 / DB-5	1%- / 5%-Phenyl-Methylpolysiloxan
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	entmineralisiertes („destilliertes“) Wasser
Dimsyl	Methylsulfinylmethanid $\text{CH}_2\text{-SO}(\text{CH}_3)$
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	degree of polymerization (Polymerisationsgrad)
DS	degree of substitution (Substitutionsgrad)
DSC	Differential Scanning Calorimetry
E.C.	Enzyme commission (Klassifikationssystem für Enzyme)
ECR	Effective Carbon Response
EI	electron impact (Elektronenstoßionisation)
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
FAB	Fast atom bombardment
FTIR	Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie
FID	Flammenionisationsdetektor
GC, GLC	Gaschromatographie, gas-liquid-chromatography
Glc	Glucose
GLC	Gas-Liquid-Chromatography
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde(n)
HOAc	Eisessig (konz. Essigsäure)
HPAEC	High-pH anion exchange chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HV	Hochvakuum

IR	Infrarot
IT	Ion Trap (Ionenfalle)
Kap.	Kapitel
m	Masse [g]
M	Molarität [mol/L]
M _w	Molekularmasse [g/mol] (Gewichtsmittel)
M _n	Molekularmasse [g/mol] (Zahlenmittel)
m/z	Masse zu Ladung, Massenzahl
MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization
MC	Methylcellulose
MeD	Methyldextran
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MRX	Magnetrelaxometrie
MS	Massenspektrometrie
MS	Molarer Substitutionsgrad (molar degree of substitution)
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernresonanzspektroskopie)
nT	nano Tesla
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
p.a.	pro analysis
PAD	pulsed amperometric detection
2-PrOH	2-Propanol
<i>p</i> -TsOH	para Toluolsulfonsäure
R _G	Gyrationsradius (Trägheitsradius)
RT	Raumtemperatur (20-24 °C)
s	Sekunde
SEM	Scanning Electron Microscopy
SMA	Standard-Methylierungs-Analyse
t	Zeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TEM	Transmissionselektronmikroskopie
TFA	trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TG, TGA	Thermogravimetrie, thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan (NMR-Referenz)
TMS	Trimethylsilyl
ToF	Time of Flight (Flugzeitmassenanalysator)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolette Strahlung
ZB 5	5 % Phenyl-Methylpolysiloxan

14 Literatur

- [1] Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe, *Produktgruppen*, <http://www.fnr-server.de/cms35/Produktgruppen.65.0.html>, abgerufen am: 10. 02. 2009, **Letzte Änderung 10/2008**.
- [2] Heinze, T., Liebert, T., Koschella, A., *Esterification of Polysaccharides*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **2006**.
- [3] Bösch, A., *Aufbau blockartig substituierter 1,4-Glucane aus Cyclodextrinen und ihre strukturelle Charakterisierung*, Dissertation, Institut für Lebensmittelchemie, TU Braunschweig, **2008**.
- [4] Pfannemüller, B., *Stärke*, in: *Polysaccharide - Eigenschaften und Nutzung*, Springer Verlag, Berlin, **1985**.
- [5] Pasteur, L., On the viscous fermentation and the butyrous fermentation, *Bull. Soc. Chim. Paris*, **1861**, 30-31.
- [6] Scheibler, C., Investigation of the nature of the gelatinous excretion (so called frog's spawn) which is observed in production of beet-sugar juices, Untersuchungen über die Natur der gallertartigen Ausscheidung (sog. "Froschlaich"), welche bei der Saftgewinnung aus Rüben beobachtet wird, *Z. Ver. Dtsch. Zucker-Ind. (Zeitschrift des Vereins für die Rübenzuckerindustrie des Deutschen Reichs)*, **1874**, 24, 309-335.
- [7] Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., Hornig, S., Functional Polymers Based on Dextran, *Adv. Polym. Sci.*, **2006**, 205, 199-291.
- [8] De Belder, A. N., Dextran, in *Amersham Biosciences AB*, Artikel Nr. 18-1166-12, **2003**.
- [9] EuropeanCommission, Opinion of the Scientific Committee on Food on a Dextran Preparation produced using *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus spp.* as a Novel Food Ingredient in Bakery Products, *CS/NF/DOS/7/ADD 3 FINAL*, **2000**.
- [10] EuropeanCommission, Entscheidung der Kommission vom 30. Januar 2001 über die Genehmigung des Inverkehrbringens einer mit Hilfe von *Leuconostoc mesenteroides* hergestellten Dextranzubereitung als neuartige Lebensmittelzutat für Backwaren gemäß der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlamentes und des Rates, *2001/122/EG*, **2001**.
- [11] Flaschel, E., Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland, *Positionspapier der DECHEMA e.V.*, **Stand November 2004**.
- [12] Vandamme, E. J., De Baets, S., Steinbüchel, A., *Biopolymers*, Polysaccharides I, Polysaccharides from Prokaryotes, Vol. 5, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, **2002**.
- [13] Autorenkollektiv, Dextrane, in: *Roempp Online Version 3.2*, Georg Thieme Verlag, **2008**.
- [14] Sabatie, J., Choplin, L., Moan, M., Doublier, J. L., Paul, F., Monsan, P., The Effect of Synthesis Temperature on the Structure of Dextran *NRRL B 512 F*, *Carbohydr. Polym.*, **1988**, 9, 87-101.
- [15] Alsop, R. M., Industrial Production of Dextrans, *Prog. Ind. Microbiol. (Bushell, M. E., Ed.) Elsevier London*, **1983**, 18, 1-44.
- [16] Kakuchi, T., Kusuno, A., Miura, M., Kaga, H., Cationic ring-opening polymerization of 1,6-anhydro-2,3,4-tri-*O*-allyl- β -D-glucopyranose as a convenient synthesis of dextran, *Macromol. Rapid Commun.*, **2000**, 21, 1003-1006.

- [17] Van Cleve, J. W., Schaefer, W. C., Rist, C. E., The structure of *NRRL B-512* dextran. Methylation studies, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 4435-4438.
- [18] Jeanes, A., Haynes, W. C., Wilham, C. A., Rankin, J. C., Melvin, E. H., Austin, M. J., Cluskey, J. E., Fisher, B. E., Tsuchiya, H. M., Rist, C. E., Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 5041-5052.
- [19] Larm, O., Lindberg, B., Svensson, S., Studies on the length of the side chains of the dextran elaborated by *Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512*, *Carbohydr. Res.*, **1971**, 20, 39-48.
- [20] Wales, M., Marshall, P. A., Weissberg, S. G., Intrinsic viscosity - molecular weight relationships for dextran, *J. Polym. Sci.*, **1953**, 10, 229-240.
- [21] Covacevich, M. T., Richards, G. N., Frequency and distribution of branching in dextran: an enzymatic method, *Carbohydr. Res.*, **1977**, 54, 311-315.
- [22] Ioan, C. E., Aberle, T., Burchard, W., Light Scattering and Viscosity Behavior of Dextran in Semidilute Solution, *Macromolecules*, **2001**, 34, 326-336.
- [23] Rolland-Sabaté, A., M. G. Mendez-Montecalvo, P. Colonna, and V. Planchot, Online Determination of Structural Properties and Observation of Deviations from Power Law Behavior, *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 1719-1730.
- [24] Liebert, T., Hornig, S., Hesse, S., Heinze, Th., Nanoparticles on the Basis of Highly Functionalized Dextrans, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 10484-10485.
- [25] De Belder, A. N., *Medical Applications of Dextran and its Derivatives* Polysaccharides in Medical Applications, New York, **1996**.
- [26] Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., Vandamme, E. J., Review: *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2005**, 80, 845-860.
- [27] McCurdy, R. D., Goff, H. D., Stanley, D. W., Properties of dextran as a cryoprotectant in ice cream, *Food Hydrocolloids*, **1994**, 8, 625-633.
- [28] McCurdy, R. D., Goff, H. D., Stanley, D. W., Stone, A. P., Rheological properties of dextran related to food applications, *Food Hydrocolloids*, **1994**, 8, 609-623.
- [29] Flodin, P., The Sephadex story, *Polym. Eng. Sci.*, **1998**, 38, 1220-1228.
- [30] Haff, L. A., Easterday, R. L., Sephacryl gels: Physical properties and evaluation of performance in gel filtration, *J. Liq. Chromatogr.*, **1978**, 1, 811-832.
- [31] Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., *Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences*, Polysaccharides 1, Springer, Berlin, Heidelberg, **2005**.
- [32] Filion, D., Lavertu, M., Buschmann, M. D., Ionization and Solubility of Chitosan Solutions Related to Thermosensitive Chitosan/Glycerol-Phosphat Systems, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 3224-3234.
- [33] Ravi Kumar, M. N. V., A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, **2000**, 46, 1-27.
- [34] Kurita, K., Controlled functionalization of the polysaccharide Chitin, *Prog. Polym. Sci.*, **2001**, 26, 1921-1971.
- [35] Autorenkollektiv, Glycosaminoglykane, Chondroitinsulfate, Heparin, Hyaluronsäure, Murein, in: *RÖMPP Online, Version 3.4*, Georg Thieme Verlag, **2009**.
- [36] Piehler, J., Brecht, A., Geckeler, K. E., Gauglitz, G., Surface modification for direct immunoprobes, *Biosensors & Bioelectronics*, **1996**, 11, 579-590.
- [37] Kerr, R. W., Neukom, H., The reaction of starch with ethylenimine, (*Die*) *Stärke*, **1952**, 10, 255-257.
- [38] Berlin, P., Klemm, D., Tiller, J., Rieseler, R., A novel soluble aminocellulose derivative type: its transparent film-forming properties and its efficient coupling

- with enzyme proteins for biosensors, *Macromol. Chem. Phys.*, **2000**, *201*, 2070-2082.
- [39] Shimizu, H., Ito, Y., Matsuyaki, Y., Iijima, H., Ogawa, T., 4,5-Dichlorophthaloyl group for amino protectin in carbohydrate chemistry, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1986**, *60*, 73-76.
- [40] Dasgupta, F., Garegg, P. J., Reductive dephthalimidation - a mild and effective method for the *N*-phthalimido deprotection during oligosaccharide synthesis, *Carbohydr. Chem.*, **1988**, *7*, 701-707.
- [41] Dunn, E. J., Zhang, X., Sun, D., Goosen, M. F. A., Synthesis of *N*-phthalimidomethyl tetra-*O*-acyl- α -D-mannopyranosides, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1993**, *50*, 252-365.
- [42] Gonera, A., *Aminofunctional Starch Derivatives: Synthesis, Analysis, and Application*, Dissertation, Institut für Lebensmittelchemie, TU Braunschweig, **2004**.
- [43] Gonera, A., Goclik, V., Baum, M., Mischnick, P., Preparation and structural characterisation of *O*-aminopropyl-starch and amylose, *Carbohydr. Res.*, **2002**, *337*, 2263-2272.
- [44] Ademovic, Z., Gonera, A., Mischnick, P., Klee, D., Biocompatible Surface Preparation Using Amino- Functionalized Amylose, *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 1429-1432.
- [45] Gonera, A., Mischnick, P., Ukeda, H., The application of *O*-aminopropyl amylose for the stabilization of horseradish peroxidase via addition and cross-linking, *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, *34*, 248-254.
- [46] Liu, C., Baumann, H., Exclusive and complete introduction of amino groups and their *N*-sulfo and *N*-carboxymethyl groups into the 6-position of cellulose without the use of protecting groups, *Carbohydr. Res.*, **2002**, *337*, 1-11.
- [47] Michaelis, N., *Nichtnatürliche Aminopolysaccharide: Synthese und Charakterisierung*, Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, T. Heinze, **2006**.
- [48] Hanessian, S., Benalil, A., Lafférière, C., The Synthesis of Functionalized Cyclodextrins As Scaffolds and Templates for Molecular Diversity, Catalysis, and Inclusion Phenomena, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 4786-4797.
- [49] Heeres, A., van Doren, H. A., Gotlieb, K. F., Bleeker, I. P., Bergsma, J., Kellogg, R. M., Synthesis, analysis and reduction of 2-nitropropyl starch, *Carbohydr. Res.*, **2001**, *330*, 191-204.
- [50] Gianni, R., Delben, F., Liut, G., Berstorff, S., Amenitsch, H., Rizzo, R., Synthesis and conformational properties of cyanoethyl-scleroglucan., *Carbohydr. Polym.*, **2002**, *47*, 387-391.
- [51] Daly, W. H., Munir, A., Aminopropylcellulose. Synthesis and Derivatization, *J. Polym. Sci.*, **1984**, *22*, 975-984.
- [52] Verraest, D. L., Zitha-Bowens, E., Peeters, J. A., Van Bekkum, H., Preparation of *O*-(Aminopropyl)inulin, *Carbohydr. Res.*, **1998**, *310*, 109-115.
- [53] Verraest, D. L., De Silva, L. P., Peters, J. A., Van Bekkum, H., Synthesis of Cyanoethyl Inulin, Aminopropyl Inulin and Carboxyethyl Inulin, *Starch*, **1996**, *48*, 191-195.
- [54] Verraest, D. L., Peters, J. A., Kuzee, H. C., Raaijmakers, H. W. C., Van Bekkum, H., Distribution of substituents in *O*-carboxymethyl and *O*-cyanoethyl ethers of inulin, *Carbohydr. Res.*, **1997**, *302*, 203-212.

- [55] Cuber, K., *Aminofunktionalisierung von Dextranen durch Reduktion eingeführter Cyanoethylgruppen*, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Fach Lebensmittelchemie, Institut für Lebensmittelchemie TU Braunschweig, P. Mischnick, **2008**.
- [56] Bieber, L. W., da Silva, M. F., Mild and efficient synthesis of propargylamines by copper-catalyzed Mannich reaction, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 8281-8283.
- [57] Tankam F., P., Mischnick, P., Hopf, H., Jones, P.G., Modification of methyl *O*-propargyl-D-glucosides: model studies for the synthesis of alkynyl based functional polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **2007**, *342*, 2931-2048.
- [58] Tankam F., P., Müller, R., Mischnick, P., Hopf, H., Alkynyl polysaccharides: synthesis of propargyl potato starch followed by subsequent derivatizations, *Carbohydr. Res.*, **2007**, *342*, 2049-2060.
- [59] Tankam Fonkou, P., *Synthese und Charakterisierung funktionalisierter O-Propargylether von Glucose und Stärke*, Dissertation, TU Braunschweig, **2006**.
- [60] De Geest, B. G., Van Camp, W., Du Prez, F. E., De Smedt, S. C., Demeesterb, J., Henninka, W. E., Biodegradable microcapsules designed via 'click' chemistry, *Chem. Commun.*, **2008**, 190-192.
- [61] Tahir, M. N., Ahmad, A., Mischnick, P., Lipase immobilization on *O*-propargyl and *O*-pentynyl dextrans and its application for the synthesis of click beetle pheromones, *Process Biochem.*, **2009**, *44*, 1276-1283.
- [62] Lu, A.-H., Salabas, E. L., Schüth, F., Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1222-1244.
- [63] Autorenkollektiv, Nanopartikel, in: *RÖMPP Online, Version 3.4*, Georg Thieme Verlag, **2009**.
- [64] Ludwig, F., Heim, E., Schilling, M., Enpuku, K., Characterization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles by fluxgate magnetorelaxometry for use in biomedical applications, *J. Appl. Phys.*, **2008**, *103*, 07A314-1-3.
- [65] Tomecko, C. G., Adams, R., The Allyl Ethers of Various Carbohydrates, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1923**, *45*, 2698-2701.
- [66] Nichols, P. L. J., Yanovsky, E., Allyl Ethers of Carbohydrates. I. Preparation and Polymerization of Tetra-allyl- α -Methyl Glucoside, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1944**, *66*, 1625-1627.
- [67] Nichols, P. L. J., Yanovsky, E., Allyl Ethers of Carbohydrates. II. Preparation and Polymerization of Polyallyl Ethers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1945**, *67*, 46-49.
- [68] Talley, E. A., Vale, M. D., Yanovsky, E., Allyl Ethers of Carbohydrates. III. Ethers of Glucose and Galactose, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1945**, *67*, 2037-2039.
- [69] Nichols, P. L. J., Wrigley, A. N., Yanovsky, E., Allyl Ethers of Carbohydrates. V. Preparation and Polymerization of β -Methallyl Ethers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1946**, *68*, 2020-2022.
- [70] Wrigley, A. N., Yanovsky, E., Allyl Ethers of Carbohydrates. VI. Polymerization of Allyl Ethers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1948**, *70*, 2194-2196.
- [71] Dubber, M., Lindhorst, T., Synthesis of octopus glycosides: core molecules for the construction of glycoclusters and carbohydrate-centered dendrimers, *Carbohydr. Res.*, **1998**, *310*, 35-41.
- [72] Dubber, M., *Synthese Kohlenhydrat-zentrierter Glycocluster und Dendrimere*, Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Hamburg, **2001**.
- [73] Ni, J., Singh, S., Wang, L.-X., Improved preparation of perallylated cyclodextrins: facile synthesis of cyclodextrin-based polycationic and polyanionic compounds, *Carbohydr. Res.*, **2002**, *337*, 217-220.

- [74] Wenz, G., Höfler, T., Synthesis of highly water-soluble cyclodextrin sulfonates by addition of hydrogen sulfite to cyclodextrin allyl ethers, *Carbohydr. Res.*, **1999**, 322, 153-165.
- [75] Kraus, T., Budesínský, M., Závada, J., General Approach to the Synthesis of Persubstituted Hydrophilic and Amphiphilic β -Cyclodextrin Derivatives, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 4595-4600.
- [76] Leydet, A., Moullet, C., Roque, J. P., Witvrouw, M., Pannecouque, C., Andrei, G., Snoeck, R., Neyts, J., Schols, D., De Clerq, E., Polyanion Inhibitors of HIV and Other Viruses. 7. Polyanionic Compounds and Polyzwitterionic Compounds Derived from Cyclodextrins as Inhibitors of HIV Transmission, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 4927-4932.
- [77] Turnbull, W. B., Stoddart, J. F., Design and Synthesis of glycodendrimers, *Mol. Biotechnol.*, **2002**, 90.
- [78] Fulton, D. A., Stoddart, J. F., An Efficient Synthesis of Cyclodextrin-Based Carbohydrate Cluster Compounds, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 1113-1116.
- [79] Wolter, C., *Kationische ringöffnende Copolymerisation von γ Cyclodextrinderivaten*, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, TU Braunschweig, P. Mischnick, **2006**.
- [80] Bösch, A., Mischnick, P., Bifunctional Building Blocks for Glyco-Architectures by TiCl_4 -Promoted Ring Opening of Cyclodextrin Derivatives, *Biomacromol.*, **2007**, 8, 2311-2320.
- [81] Autorenkollektiv, Stärkeether, in: *RÖMPP Online, Version 3.4*, Georg Thieme Verlag, **2009**.
- [82] Talley, E. A., Hamilton, R. M., Schwartz, J. H., Brown, C. A., Yanovsky, E., Preparation of allyl starch, *U. S. Dept. Agr., Bur. Agr. and Ind. Chem.*, **1947**.
- [83] Yanovsky, E., Allyl starch- a review, *U. S. Bur. Agr. and Ind. Chem., Circ. Ser.*, **1953**, *Eastern Regional Research Lab. Philadelphia PA*.
- [84] Nichols, P. L. J., Hamilton, R. M., Smith, L. T., Yanovsky, E., Allyl Ether of Starch- Preparation and Industrial Possibilities, *Ind. Eng. Chem.*, **1945**, 37, 201-202.
- [85] Wilham, C. A., McGuire, T. A., Rudolphi, A. S., Mehlretter, C. L., Polymerization Studies with Allyl Starch, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1963**, 7, 1403-1410.
- [86] Hamilton, R. M., Yanovsky, E., Allyl Ethers of Carbohydrates IV. Mixed Allyl Ethers of Starch, *Ind. Eng. Chem.*, **1946**, 38, 864-866.
- [87] Bhuniya, S. P., Rahman, MD. S., Satyanand, A. J., Gharia, M. M., Dave, A. M., Novel Route to Synthesis of Allyl Starch and Biodegradable Hydrogel by Copolymerizing Allyl-Modified Starch with Methacrylic Acid and Acrylamide, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2003**, 41, 1650-1658.
- [88] Sakurada, I., Untersuchungen über die Allylcellulose, *Zeitschrift für angewandte Chemie*, **1929**, 42, 549-550.
- [89] Haidasch, I., Voss, J., *Verfahren zur Herstellung von Celluloseallyläthern*, DE Patent 1065828, Kalle & Co. Aktiengesellschaft Wiesbaden-Biebrich, **1958**.
- [90] Yoshimura, S., Research on the Allylcellulose. Part 1: Preparation of the Completely Soluble Allylcellulose, *Sen'i Gakkaishi*, **1965**, 21, 317-326.
- [91] Yoshimura, S., Research on the Allylcellulose. Part 2: Reactions between Allylcellulose and Vinylmonomers and Properties of Reaction Product between Allylcellulose and Methylmethacrylate, *Sen'i Gakkaishi*, **1965**, 21, 358-364.
- [92] Yoshimura, S., Research on the Allylcellulose. Part 3: On the mechanisms of Deterioration of the Allylcellulose and its Stabilizing Method. Part 4: On the Alkaline Treatment of the Allylcellulose, *Sen'i Gakkaishi*, **1965**, 21, 410-424.

- [93] Kondo, T., Isogai, A., Ishizu, A., Nakano, J., Preparation of Completely Allylated and Methallylated Celluloses from Methylcellulose and Cellulose Acetate, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1987**, 34, 55-63.
- [94] Kondo, T., Ishizu, A., Nakano, J., Preparation of Aldehydocelluloses from Completely Allylated Methylcellulose, Allylated Ethylcellulose, and Tri-*O*-Allylcellulose by Ozonization, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1988**, 35, 885-893.
- [95] Lin, M.-S., Huang, C.-S., Syntheses and Characterizations of Allyl Cellulose and Glycidyl Cellulose, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **1992**, 30, 2303-2313.
- [96] Sawatari, C., Yagi, T., Introduction of amino groups into cellulose via (2,3-dibromopropyl) cellulose under mild conditions, *Sen'i Gakkaishi*, **1991**, 47, 467-475.
- [97] Sachinvala, N. D., Winsor, D. L., Hamed, O. A., Maskos, K., Niemczura, W. P., Tregre, G. J., Glasser, W., Bertoniere, N. R., The Physical and NMR Characterizations of Allyl- and Crotylcelluloses, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2000**, 38, 1889-1902.
- [98] Heinze, T., Lincke, T., Fenn, D., Koschella, A., Efficient allylation of cellulose in dimethyl sulfoxide/tetrabutylammonium fluoride trihydrate, *Polym. Bull.*, **2008**, 61, 1-9.
- [99] Nudga, L. A., Petrova, V. A., Denisov, V. M., Petropavlovskii, G. A., Allylation of Chitosan, *Inst. Vysokomol. Soedin*, **1991**, 64, 229-232.
- [100] Nudga, L. A., Petrova, V. A., Petropavlovskii, G. A., Seliverstov, A. R., Sukhov, N. L., Ershov, B. G., Radiochemical transformation of allyl chitosan, *Inst. Vysokomol. Soedin*, **1991**, 64, 617-622.
- [101] Nudga, L. A., Petrova, V. A., Lebedeva, M. F., Effect of Allyl Substitution in Chitosan on the Structure of Graft Copolymers, *Russ. J. Appl. Chem.*, **2003**, 76, 1978-1982.
- [102] Holmberg, A., Meurling, L., Preparation of Sulfhydrylborane-Dextran Conjugates for Boron Neutron Capture Therapy *Bioconjugate Chem.*, **1993**, 4, 570-573.
- [103] Gao, X., Mathieu, H. J., Schawaller, M., Surface modification of polystyrene biochip for biotin-labelled protein/streptavidin or neutravidin coupling used in fluorescence assay, *Surf. Interface Anal.*, **2004**, 36, 1507-1512.
- [104] Isogai, A., Ishizu, A., Nakano, J., Preparation of Tri-*O*-Substituted Cellulose Ethers by the Use of Nonaqueous Cellulose Solvent, *J. Appl. Polym. Sci.*, **1984**, 29, 3873-3882.
- [105] Mootoo, D. R., Date, V., Fraser-Reid, B., *n*-Pentenyl Glycosides Permit the Chemospecific Liberation of the Anomeric Center, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2662-2663.
- [106] Fraser-Reid, B., Ododong, U. E., Wu, Z., Ottosson, H., Merritt, J. R., Rao, C. S., Roberts, C., Madsen, R., *n*-Pentenyl Glycosides in Organic Chemistry: A Contemporary Example of Serendipity, *Synlett*, **1992**, 927-942.
- [107] Buskas, T., Söderberg, E., Konradsson, P., Fraser-Reid, B., Use of *n*-Pentenyl Glycosides as Precursors to Various Spacer Functionalities, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 958-963.
- [108] Lin, C.-C., Yeh, Y.-C., Yang, C.-Y., Chen, C.-L., Chen, G.-F., Chen, C.-C., Wu, Y.-C., Selective Binding of Mannose-Encapsulated Gold Nanoparticles to Type 1 Pilli in *Escherichia coli*, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 3508-3509.
- [109] Damez, C., Bouquillon, S., Harakat, D., Henin, F., Muzart, J., Pezron, I., Komunjer, L., Alkenyl and alkenoyl amphiphilic derivatives of D-xylose and their surfactant properties, *Carbohydr. Res.*, **2007**, 342, 154-162.

- [110] Nudga, L. A., Plisko, E. A., Petropavlovskii, G. A., Graft polymerisation of vinyl acetate onto allyloxyethyl cellulose in an aqueous medium, *Inst. Vysokomol. Soedin*, **1989**, 62, 2569-2572.
- [111] Tsai, J. J., Meier, E. A., *Polysaccharide graft copolymers containing reactive aminoethyl halide group*, U.S. Patent 4,973,641, National Starch and Chemical Investment Holding Corporation, **1990**.
- [112] Huijbrechts, A. M. L., Huang, J., Schols, H. A., van Lagen, B., Visser, G. M., Boeriu, C. G., Sudhölter, E. J. R., 1-Allyloxy-2-hydroxy-propyl-starch: Synthesis and Characterization, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **2007**, 45, 2734-2744.
- [113] Huijbrechts, A. M. L., Desse, M., Budtova, T., Franssen, M. C. R., Visser, G. M., Boeriu, C. G., Sudhölter, E. J. R., Physicochemical properties of etherified maize starches, *Carbohydr. Polym.*, **2008**, 74, 170-184.
- [114] Huijbrechts, A. M. L., Vermonden, T., Bogaert, P., Franssen, M. C. R., Visser, G. M., Boeriu, C. G., Sudhölter, E. J. R., Optimization of the synthesis of 1-allyloxy-2-hydroxy-propyl-starch through statistical experimental design, *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 77, 25-31.
- [115] Greene, T. W., Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Chemistry*, 3rd Edition, John Wiley & Sons Inc., Weinheim, New York, **1999**.
- [116] Gent, P. A., Gigg, R., The Allyl Ether as Protecting Group in Carbohydrate Chemistry. Part VII: The 2-*O*-Allyl Group as a Non-participant in 1,2-*cis*-Glycoside Synthesis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1974**, 361-363.
- [117] Guibé, F., Allylic Protecting Groups and Their Use in a Complex Environment, Part I: Allylic Protection of Alcohols, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 13509-13556.
- [118] Corey, E. J., Suggs, J. W., Selective cleavage of allyl ethers under mild conditions by transition metal reagents, *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 3224-3224.
- [119] Gigg, R., Warren, C. D., The Allyl Ether as a Protecting Group in Carbohydrate Chemistry, *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 18, 1683-1684.
- [120] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin, **2008**.
- [121] Brückner, R., *Reaktionsmechanismen- Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [122] Laue, T., Plagens, A., *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*, Teubner Studienbücher Chemie, 3., überarbeitete und erweiterte Auflage, B. G. Teubner, Stuttgart, **1998**.
- [123] Pappas, J. J., Keaveney, W. P., Gancher, E., Berger, M., A New and Convenient Method for Converting Olefins to Aldehyds, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 36, 4273-4278.
- [124] Bernstein, M. A., Hall, L. D., A general synthesis of model glycoproteins: coupling of alkenyl glykosides to proteins using reductive ozonolysis followed by reductive amination with sodium cyanoborohydride, *Carbohydr. Res.*, **1980**, 78, C1-C3.
- [125] Griesbaum, K., Problems and Possibilities of the Free-Radical Addition of Thiols to Unsaturated Compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1970**, 9, 273-287.
- [126] van Seeventer, P. B., van Dorst, J. A. L. M., Siemerink, J. F., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Thiol addition to protected allyl glycosides: an improved method for the preparation of spacer-arm glykosides, *Carbohydr. Res.*, **1997**, 300, 369-373.
- [127] Heidecke, C., Lindhorst, T., Iterative Synthesis of Spaced Glykodendrons as Oligomannoside Mimetics and Evaluation of Their Antiadhesive Properties, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 9056-9067.

- [128] Acosta Ortiz, R., Garcia Valdéz, A. E., Martinez Aguilar, M. G., Berlanga Duarte, M. L., An effective method to prepare sucrose polymers by Thiol-Ene photopolymerization, *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 78, 282-286.
- [129] Roy, R., Laferrière, C. A., Synthesis of antigenic copolymers of *N*-acetylneuraminic acid binding to wheat germ agglutinin and antibodies, *Carbohydr. Res.*, **1988**, 177, C1-C4.
- [130] Lee, R. T., Lee, Y. C., Synthesis of 3-(2-Aminoethylthio)propyl Glycosides, *Carbohydr. Res.*, **1974**, 37, 193-201.
- [131] Halkes, K. M., Vermeer, H. J., Slaghek, T. M., van Hooft, P. A. V., Loof, A., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., Preparation of spacer-containing di-, tri-, and tetrasaccharide fragments of the circulating anodic antigen of *Schistosoma mansoni* for diagnostic purposes, *Carbohydr. Res.*, **1998**, 309, 175-188.
- [132] Brown, H. C., Subba Rao, B. C., *J. Amer. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 5694-5695.
- [133] Brown, H. C., Kim, K.-W., Srebnik, M., Singaram, B., Organoboranes for Synthesis. 7. An Improved General Synthesis of Primary Amines from Alkenes via Hydroboration-Organoborane Chemistry, *Tetrahedron*, **1987**, 43, 4071-4078.
- [134] Liaigre, J., Dubreuil, D., Pradère, J.-P., Bouhours, J.-F., A novel synthesis of α -D-Galp-(1-3)- β -D-Galp-1-*O*-(CH₂)₃-NH₂, its linkage to activated matrices and absorption of anti- α Gal xenoantibodies by affinity columns, *Carbohydr. Res.*, **2000**, 325, 265-277.
- [135] Beller, M., Breindl, C., Eichberger, M., Hartung, C. G., Seayad, J., Thiel, O. R., Tillack, A., Trauthwein, H., Advances and Adventures in Amination Reactions of Olefins and Alkynes, *Synlett*, **2002**, 10, 1579-1594.
- [136] Müller, T. E., Beller, M., Metal-Initiated Amination of Alkenes and Alkynes, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 675-703.
- [137] Nobis, M., Drießen-Hölscher, B., Recent Developments in Transition Metal Catalyzed Intermolecular Hydroamination Reactions - A Breakthrough?, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 3983-3985.
- [138] Beller, M., Tillack, A., Seayad, J., *Catalytic Amination Reactions of Olefins and Alkynes*, Transition Metals for Organic Synthesis, 2nd Edition, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [139] Beller, M., Seayad, J., Tillack, A., Jiao, H., Katalytische Markownikow- und Anti-Markownikow-Funktionalisierung von Alkenen und Alkinen, *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 3448-3479.
- [140] Karskela, M., Virta, P., Malinen, M., Urtti, A., Lönnberg, H., Synthesis and Cellular Uptake of Fluorescently Labeled Multivalent Hyaluronan Disaccharide Conjugates of Oligonucleotide Phosphorothioates, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 2549-2558.
- [141] Pearce, A. J., Sinay, P., Diisobutylaluminium-Promoted Regioselective De-*O*-benzylation of Perbenzylated Cyclodextrins: A Powerfull New Strategy for the Preparation of Selectively Modified Cyclodextrins, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 3610-3612.
- [142] Lehmann, J., *Kohlenhydrate*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1996**.
- [143] Evans, M. E., Methyl 4,6-*O*-benzylidene- α - and β -D-glucosides, *Carbohydr. Res.*, **1972**, 21, 473-475.
- [144] Zhang, J., Ragauskas, A. J., Synthesis of benzylidenated hexopyranosides in ionic liquids, *Carbohydr. Res.*, **2005**, 340, 2812-2815.
- [145] Yoza, K., Ono, Y., Yoshihara, K., Akao, T., Shinmori, H., Takeuchi, M., Shinkai, S., Reinhoudt, D. N., Sugar-integrated gelators of organic fluids: on their versatility

- as building-blocks and diversity in superstructures, *Chem. Commun.*, **1998**, 907-908.
- [146] Wang, G., Cheuk, S., Williams, K., Sharma, V., Dakessian, L., Thorton, Z., Synthesis and characterization of monosaccharide lipids as novel hydrogelators, *Carbohydr. Res.*, **2006**, *341*, 705-716.
- [147] Tiller, J. C., Increasing the Local Concentration of Drugs by Hydrogel Formation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 3072-3075.
- [148] Beier, R. C., Bradford, P. M., Strobel, G. A., A synthesis of diastereomeric isofloridoside, *Carbohydr. Res.*, **1981**, *93*, 141-143.
- [149] Dittmann, H., Scharwächter, K., König, W. A., Synthesis and silica-based immobilization of monofunctionalized cyclomaltoheptaose derivatives for enantioselective HPLC, *Carbohydr. Res.*, **2000**, *324*, 75-96.
- [150] Noyori, R., Aoki, M., Sato, K., Green oxidation with aqueous hydrogen peroxide, *Chem. Commun.*, **2003**, 1977-1986.
- [151] Kropf, H., Weickmann, A., Zeller, K.-P., *Peroxo-Verbindungen als Oxidationsmittel. Epoxygenierung von Alkenen*, Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Version 3.7 (release date: March 2009), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2009**.
- [152] Wu, P., Liu, Y., He, M., Tatsumi, T., A novel titanosilicate with MWW structure-Catalytic properties in selective epoxidation of diallyl ether with hydrogen peroxide, *J. Catal.*, **2004**, *228*, 183-191.
- [153] Timmermans, J. W., Visser, H. A. A. H., Peeters, W., Kersten, W. J. A., Slaghek, T. M., Gotlieb, K. F., *Reactive Starch Derivatives*, Multifunctional Starch Derivatives, ATO-DLO Business Unit Renewable Resources, Department Fibre & Paper Technology, Wageningen, **2002**.
- [154] Murray, R. W., Dioxiranes, *Chem. Rev.*, **1989**, *89*, 1187-1201.
- [155] Adam, W., Saha-Möller, C. R., Zhao, C.-G., Dioxirane Epoxidation of Alkenes, *Org. React.*, **2002**, *61*, 220-253.
- [156] Frohn, M., Wang, Z.-X., Shi, Y., A Mild and Efficient Epoxidation of Olefins Using in Situ Generated Dimethyldioxirane at High pH, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 6425-6426.
- [157] Mello, R., Fiorentino, M., Sciacovelli, O., Curci, R., On the Isolation and Characterization of Methyl(trifluoromethyl)dioxirane, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 3890-3891.
- [158] Mello, R., González-Núñez, M. E., Asenio, G., A Simple Protocol for the Generation of Methyl(trifluoromethyl)dioxirane, *Synlett*, **2007**, *1*, 47-50.
- [159] Charette, A., Côté, B., Carbohydrates as Chiral Auxiliaries: The Asymmetric Epoxidation Reaction of Olefins, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 2283-2286.
- [160] Broshears, W. C., Esteb, J. J., Richter, J., Wilson, A. M., Simple Epoxide Formation for the Organic Laboratory Using Oxone, *J. Chem. Education*, **2004**, *81*, 1018-1019.
- [161] Houben, J., Weyl, T., *11. Anlagerung von Ammoniak, Amino- und Iminverbindungen an Alkylenoxyde unter Ringsprengung*, Houben-Weyl, Science of Synthesis, Methods of Molecular Transformations, Version 3.7 (release date: March 2009), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2009**.
- [162] Eicher, J., *Verfahren zur Herstellung von alpha-Aminoalkanolen*, EP 0 364 708 A1, Kali-Chemie Aktiengesellschaft, **1989**.
- [163] Chini, M., Crotti, P., Macchia, F., Efficient Metal Salt Catalyzed Azidolysis of Epoxides with Sodium Azide in Acetonitrile, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 5641-5644.

- [164] Chini, M., Crotti, P., Macchia, F., Metal Salts as New Catalysts for Mild and Efficient Aminolysis of Oxirans, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 4661-4664.
- [165] Chini, M., Crotti, P., Flippin, L. A., Macchia, F., Regiochemical control of the Ring-Opening of 1,2-Epoxides by Means of Chelating Processes. 3. Aminolysis and Azidolysis of the cis- and trans-Oxides Derived from 4-(Benzyloxy)cyclohexene, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 7043-7048.
- [166] Miljkovic, D., Vukojevic, N., Hranisavjevic, J., Nucleophilic Opening of the Epoxide Ring in Carbohydrates. I. Reaction of 1,6:2,3-Dianhydro- β -D-Ribo-hexopyranose with Ammonia and Dimethylamine, *Bulletin de la Società Chimique Beograd*, **1979**, 44, 167-172.
- [167] Andriuzzi, O., Gravier-Pelletier, C., Bertho, G., Prang , T., Le Merrer, Y., Synthesis and glycosidase inhibitory activity of new hexa-substituted C8-glycomimetics, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2005**, 1.
- [168] Past , M., Rodriguez, B., Riera, A., Peric s, M. A., Synthesis of enantiopure amino alcohols by ring-opening of epoxyalcohols and epoxyethers with ammonia, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 8369-8372.
- [169] Vougioukas, A. E., Kagan, H. B., Oxirane Ring Opening Reactions with Thiols Catalyzed by Lanthanide Complexes, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 6065-6068.
- [170] Wermann, S., Heimrich, M., Simat, T. J., Analytik von Epoxidverbindungen in Bedarfsgegenst nden, *Lebensmittelchemie, Zeitschrift der LChG*, **2007**, 61, 55.
- [171] Kunz, H., Sager, W., Schanzenbach, D., Decker, M., Carbohydrates as Chiral Templates: Stereoselective Strecker Synthesis of D- α -Amino Nitriles and Acids Using *O*-Pivaloylated D-Galactosylamine as the Auxiliary, *Liebigs Ann. Chem.*, **1991**, 649-654.
- [172] Valpuesta, M., Durante, P., López-Herrera, F. J., Completely regioselective Oxirane Opening of (2S,3R,4R)-N,N-Dimethyl-2,3-Epoxy-4,5-O-Isopropylidene-4,5-Dihydroxypentanamide by Nitrogen Nucleophiles, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 4681-4684.
- [173] Wroblewski, A. E., Halajewska-Wosik, A., An Efficient Synthesis of Enantiomeric (*S*)-Phosphocarnitine, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 2758-2763.
- [174] Bieg, T., Szeja, W., Removal of *O*-Benzyl Protective Groups by Catalytic Transfer Hydrogenation, *Synth. Comm.*, **1985**, 76-77.
- [175] Zimmermann, B., Herwig, J., Beller, M., The First Efficient Hydroaminomethylation with Ammonia: With Dual Metal Catalysts and Two-Phase Catalysis to Primary Amines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2372-2375.
- [176] Ahmed, M., Seayad, A. M., Jackstell, R., Beller, M., Amines made easily: A Highly Selective Hydroaminomethylation of Olefins, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 10311-10318.
- [177] Mischnick, P., Momcilovic, D., Chemical Structure Analysis of Starch and Cellulose Derivatives, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **2010**, 63.
- [178] K hler, S., Liebert, T., Heinze, T., Vollmer, A., Mischnick, P., Möllmann, E., Becker, W., Interactions of ionic liquids with polysaccharides 9. Hydroxyalkylation of cellulose without additional inorganic bases., *Cellulose*, **2009**, im Druck.
- [179] Vollmer, A., Voiges, K., Bork, C., Fiege, K., Cuber, K., Mischnick, P., Comprehensive analysis of the substitution pattern in dextran ethers with respect to the reaction conditions, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 395, 1749-1768.
- [180] Normann, B., Partial Methylation of Dextran, *Acta. Chem. Scand.*, **1968**, 22, 1381-1385.

- [181] De Belder, A. N., Norrman, B., The substitution patterns of *O*-(2-hydroxyethyl)starch and *O*-(2-hydroxyethyl)dextran, *Carbohydr. Res.*, **1969**, *10*, 391-394.
- [182] Zeisel, S., Zum quantitativen Nachweise von Methoxyl, *Monatshefte für Chemie*, **1886**, *8*, 406-408.
- [183] Zeisel, S., Über ein Verfahren zum quantitativen Nachweise von Methoxyl, *Monatshefte für Chemie*, **1885**, *6*, 989-996.
- [184] The United States Pharmacopeia, in: *The United States Pharmacopeia*, Rockville, **2006**.
- [185] Huynh, R., Chaubet, F., Jozefonvicz, J., Carboxymethylation of dextran in aqueous alcohol as the first step of the preparation of derivatized dextrans, *Angew. Makromol. Chem.*, **1998**, *254*, 61-65.
- [186] Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R., Zhang, X., Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction, *Carbohydr. Res.*, **2005**, *340*, 1914-1917.
- [187] Groff, J. L., Cherniak, R., The incorporation of amino groups into cross-linked Sepharose by use of (3-aminopropyl)triethoxysilane, *Carbohydr. Res.*, **1980**, *87*, 302-305.
- [188] van Dijk-Wolthuis, W. N. E., Franssen, O., Talsma, H., van Steenbergen, M. J., Kettenes-van den Bosch, J. J., Hennink, W. E., Synthesis, Characterization, and Polymerization of Glycidyl Methacrylate Derivatized Dextran, *Macromolecules*, **1995**, *28*, 6317-6322.
- [189] van Dijk-Wolthuis, W. N. E., Kettenes-van den Bosch, J. J., van der Kerk-van Hoof, A., Hennink, W. E., Reaction of Dextran with Glycidyl Methacrylate: An Unexpected Transesterification, *Macromolecules*, **1997**, *30*, 3411-3413.
- [190] Tezuka, Y., Imai, K., Oshima, M., Chiba, T., Determination of substituent distribution in cellulose ethers by means of a carbon-13 NMR study on their acetylated derivatives. 1. Methylcellulose, *Macromolecules*, **1987**, *20*, 2413-2418.
- [191] Tüting, W., Albrecht, G., Volkert, B., Mischnick, P., Structure analysis of carboxymethyl starch by capillary electrophoresis and enzymic degradation, *Starch*, **2004**, *56*, 315-321.
- [192] Abballe, F., Toppazzini, M., Campa, C., Uggeri, F., Paoletti, S., Study of molar response of dextrans in electrochemical detection, *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1149*, 38-45.
- [193] Larsson, M., Sunberg, R., Folestad, S., On-line capillary electrophoresis with mass spectrometry detection for the analysis of carbohydrates after derivatization with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid, *J. Chromatogr. A*, **2001**, *934*, 75-85.
- [194] Erler, U., Mischnick, P., Stein, A., Klemm, D., Determination of the substitution pattern of cellulose methyl ethers by HPLC and GLC- comparison of methods, *Polym. Bull.*, **1992**, *29*, 349-356.
- [195] Cataldi, T. R. I., Campa, C., De Benedetto, G. E., Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, 368.
- [196] Kragten, E. A., Kamerling, J. P., Vliegenthart, J. F. G., Composition analysis of carboxymethylcellulose by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *J. Chromatogr.*, **1992**, *623*, 49-53.
- [197] Adden, R., Mischnick, P., A novel method for the analysis of the substitution pattern of *O*-methyl- α - and β -1,4-glucans by means of electrospray ionisation-mass spectrometry/collision induced dissociation, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2005**, *242*, 63-73.

- [198] De Belder, A. N., Norrman, B., The distribution of substituents in partially acetylated dextrans, *Carbohydr. Res.*, **1968**, 8, 1-6.
- [199] Björndal, H., Hellerqvist, C. G., Lindberg, B., Svensson, S., Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Methylation Analysis of Polysaccharides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1970**, 9, 610-619.
- [200] Biermann, J. J. M., G. D., *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, CRC Press, **1989**.
- [201] Rolf, D., Gray, G. R. , Reductive cleavage of glycosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 3539-3541.
- [202] Ackman, R. G., Fundamental groups in the response of flame ionization detectors to oxygenated aliphatic hydrocarbons, *J. Gas Chromatogr.*, **1964**, 2, 173-179.
- [203] Addison, R. F., Ackman, R. G., Flame ionization detector molar responses for methyl esters of some polyfunctional metabolic acids, *J. Gas Chromatogr.*, **1968**, 6, 135-138.
- [204] Mares, P., Skorepa, J., Friedrich, M., Computerized quantitative analysis of methyl and ethyl esters of long chain fatty acids by gas-liquid chromatography using relative molar response, *J. Chromatogr.*, **1969**, 42, 435-441.
- [205] Sweet, D. P., Shapiro, R. H., Albersheim, P., Quantitative analysis by various GLC [gas-liquid chromatography] response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates, *Carbohydr. Res.*, **1975**, 40, 217-225.
- [206] Arisz, P. W., Kauw, H. J. J., Boon, J. J., Substituent distribution along the cellulose backbone in *O*-methylcelluloses using GC and FAB-MS for monomer and oligomer analysis, *Carbohydr. Res.*, **1995**, 271, 1-14.
- [207] Mischnick, P., Kühn, G., Model studies on methyl amyloses: correlation between reaction conditions and primary structure, *Carbohydr. Res.*, **1996**, 290, 199-207.
- [208] Adden, R., Müller, R., Mischnick, P., Analysis of the substituent distribution in the glucosyl units and along the polymer chain of hydroxypropylmethyl celluloses and statistical evaluation, *Cellulose*, **2006**, 13, 459-476.
- [209] Adden, R., W. Niedner, R. Müller, and P. Mischnick, Comprehensive Analysis of the Substituent Distribution in the Glucosyl Units and along the Polymer Chain of Hydroxyethylmethyl Celluloses and Statistical Evaluation, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 1146-1157.
- [210] Adden, R., Müller, R., Brinkmalm, G., Ehrler, R., Mischnick, P., Comprehensive analysis of the substituent distribution in hydroxyethyl celluloses by quantitative MALDI-TOF-MS, *Macromol. Biosci.*, **2006**, 6, 435-444.
- [211] Mischnick, P., Challenges in structure analysis of polysaccharide derivatives, *Cellulose*, **2001**, 8, 245-257.
- [212] Saake, B., Lebioda, S., Puls, J., Analysis of the substituent distribution along the chain of water-soluble methyl cellulose by combination of enzymatic and chemical methods, *Holzforschung*, **2004**, 58, 97-104.
- [213] Adden, R., Melander, C., Brinkmalm, G., Gorton, L., Mischnick, P., New Approaches to the Analysis of Enzymatically Hydrolyzed Methyl Cellulose. Part 1. Investigation of Structural Parameters on the Extent of Degradation, *Biomacromol.*, **2006**, 7, 1399-1409.
- [214] Melander, C., Adden, R., Brinkmalm, G., Gorton, L., Mischnick, P., New Approaches to the Analysis of Enzymatically Hydrolyzed Methyl Cellulose. Part 2. Comparison of Various Enzyme Preparations, *Biomacromol.*, **2006**, 7, 1410-1421.
- [215] Tüting, T., Wegemann, K., Mischnick, P., Enzymatic degradation and electrospray tandem mass spectrometry as tools for determining the structure of cationic starches prepared by wet and dry methods, *Carbohydr. Res.*, **2004**, 339, 637-648.

- [216] Steeneken, P. A. M., Tas, A. C., Woortman, A. J. J., Sanders, P., Mijland, J. H. C., de Weijs, L. G. R., Substitution patterns in methylated potato starch as revealed from the structure and composition of fragments in enzymatic digests, *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 2411-2416.
- [217] Wilke, O., Mischnick, P., Determination of the substitution pattern of cationic starch ethers, *Starch*, **1997**, *49*, 453-458.
- [218] Enebro, J., Momcilovic, D., Siika-aho, M., Karlsson, S., Investigation of endoglucanase selectivity on carboxymethyl cellulose by mass spectrometric techniques, *Cellulose*, **2009**, *16*, 271-280.
- [219] Khalikova, E., Susi, P., Korpela, T., Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications, *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, **2005**, 306-325.
- [220] Adden, R., Müller, R., Mischnick, P., Fractionation of methyl cellulose according to polarity - a tool to differentiate first and second order heterogeneity of the substituent distribution *Macromol. Chem. Phys.*, **2006**, *207*, 954-965.
- [221] Saake, B., Horner, S., Kruse, T., Puls, J., Liebert, T., Heinze, T., Detailed investigation on the molecular structure of carboxymethyl cellulose with unusual substitution pattern by means of an enzyme-supported analysis, *Macromol. Chem. Phys.*, **2000**, *201*, 1996-2002.
- [222] Fitzpatrick, F., Schagerlöf, H., Anderson, T., Richardson, S., Tjernhede, F., Wahlund, K.-G., Wittgren, B., NMR, Cloud-Point Measurements and Enzymatic Depolymerization: Complementary Tools to Investigate Substituent Patterns in Modified Celluloses, *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 2909-2917.
- [223] Liebert, T., Heinze, Th., *Induced Phase Separation: A New Synthetic Concept in Cellulose Chemistry*, ACS Symp., Cellulose Derivatives, Modification, Characterization and Nanostructures, Ser. 688, Washington DC **1998**.
- [224] Spurlin, H. M., Arrangement of Substituents in Cellulose Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1939**, *61*, 2222-2227.
- [225] Mischnick, P., Selectivity in enzymic Degradation of Methyl Amylose, *Starch*, **2001**, *53*, 110-120.
- [226] Franssen, O., van Ooijen, R. D., de Boer, D., Maes, R. A. A., Herron, J. N., Hennink, W. E., Enzymatic Degradation of Methacrylated Dextrans, *Macromolecules*, **1997**, *30*, 7408-7413.
- [227] Wolfrom, M. L. and N. E. Franks, *Partial acid hydrolysis of amylopectin, β -Maltose, β -isomaltose, and β -nigerose octaacetate*, in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, R.L. Whistler and J.N. BeMiller, Editors. **1964**, Wiley: New York. S. 250-252.
- [228] Capon, B., Mechanism in Carbohydrate Chemistry, *Chem. Rev.*, **1969**, *69*, 407-498.
- [229] Adden, A., *Substitution Patterns in and along Polymer Chains - New Approaches for Carboxymethyl Cellulose*, Doktorarbeit, TU Braunschweig, **2009**.
- [230] Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S., Starch granules: structure and biosynthesis, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1998**, *23*, 85-112.
- [231] Bertoft, E., Avall, A.-K., Structural analysis on the amylopectin of waxy-barley large starch granules, *J. Inst. Brewery*, **1992**, *98*, 433-437.
- [232] Segota, S., Tezak, D., Spontaneous formation of vesicles, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2006**, *121*, 51-75.
- [233] Vera, D. R., Wallace, A. M., Hoh, C. K., Mattrey, R. F., A Synthetic Macromolecule for Sentinel Node Detection: ^{99m}Tc -DTPA-Mannosyl-Dextran, *J. Nucl. Med.*, **2001**, *42*, 951-959.

- [234] Jarrett, B. R., Frendo, M., Vogan, J., Louie, A. Y., Size-controlled synthesis of dextran sulfate coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging, *Nanotechnology*, **2007**, *18*, 035603/1-035603/7.
- [235] Chan, H. T., Do, Y. Y., Huang, P. L., Chien, P. L., Chan, T. S., Liu, R. S., Huang, C. Y., Yang, S. Y., Horng, H. E., Preparation and properties of bio-compatible magnetic Fe₃O₄ nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2006**, *304*, 415-417.
- [236] Horák, D., Rittich, B., Spanová, A., Carboxyl-functionalized magnetic microparticle carrier for isolation and identification of DNS in diary products, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2007**, *311*, 249-254.
- [237] Bautista, M. C., Bomati-Miguel, O., Del Puerto Morales, M., Serna, C. J., Veintemillas-Verdaguer, S., Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, *293*, 20-27.
- [238] Misawa, T., Hashimoto, K., Shimodaira, S., The Mechanism of Formation of Iron Oxide and Oxyhydroxides in Aqueous Solutions at Room Temperature, *Corros. Sci.*, **1974**, *14*, 131-149.
- [239] Xuan, S., Hao, L., Jiang, W., Gong, X., Hu, Y., Chen, Z., Preparation of water-soluble magnetic nanocrystals through hydrothermal approach, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2007**, *308*, 210-213.
- [240] Kawaguchi, T., Hasegawa, M., Structure of dextran-magnetite complex: relation between conformation of dextran chains covering core and its molecular weight, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.*, **2000**, *11*, 31-35.
- [241] Kawaguchi, T., Hanaichi, T., Hasegawa, M., Maruno, S., Dextran-magnetite complex: conformation of dextran chains and stability of solution, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.*, **2001**, *12*, 121-127.
- [242] Paul, K. G., Frigo, T. B., Groman, J. Y., Groman, E. V., Synthesis of Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides Using Reduced Polysaccharides, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*, 394-401.
- [243] Sun, S., Zeng, H., Robinson, D. B., Raoux, S., Rice, P. M., Wang, S. X., Li, G., Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *126*, 273-279.
- [244] Gonzáles-Núñez, M. E., Mello, R., Olmos, A., Asenio, G., Baeyer-Villiger Oxidation with Potassium Peroxomonosulfate Supported on Acidic Silica Gel, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 10879-10882.